

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
23, chemin des Capelles  
31 076 TOULOUSE cedex 03

CIRDES  
Centre International de Recherche-Développement de l'Elevage en zone Subhumide  
01 B.P. 454  
Bobo Dioulasso 01  
BURKINA FASO

CIRAD  
Campus International de Baillarguet  
34 398 MONTPELLIER cedex 05

---

**CERTIFICAT D'ETUDES APPROFONDIES VETERINAIRES  
PATHOLOGIES ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

**Année 2002 - 2003**

---

**RAPPORT DE STAGE**

**ESSAI D'IMMUNISATION DE BOVINS  
CONTRE  
*GLOSSINA PALPALIS GAMBIENSIS*  
A PARTIR D'ANTIGENES  
INTESTINAUX DE GLOSSINES**

*par*  
*Solenne COSTARD*









*Mes remerciements au CIRDES, qui m'a permis de réaliser ce travail.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce stage.*

*Merci à Bila CENE, Simon KABORE et Wilfried YONI pour leur difficile travail de dissection.*

*Merci à Simon KABORE et Sylla SOULEYMANE de m'avoir assisté dans mes manipulations.*

*Merci à Géraldine BOSSARD pour sa formation en western blots et ses nombreux conseils.*

*Je remercie Marc DESQUESNES et Philippe JACQUIET de m'avoir encadré et conseillé tout au long de mon stage.*

*Merci à tous les amis bobolais sans lesquels ce stage n'aurait pas été aussi agréable.*

*Merci à ma famille et à Alexis pour leur soutien continu...*



# SOMMAIRE

## Synthèse bibliographique

<b>1.</b>	<b><u>LES TRYPANOSOMOSES DU BÉTAIL</u></b>	<b>11</b>
1.1.	<u>Historique</u>	11
1.2.	<u>Description de la maladie</u>	11
1.3.	<u>Conséquences économiques</u>	12
1.4.	<u>Méthodes de lutte</u>	12
<b>2.</b>	<b><u>ESSAIS D'IMMUNISATION CONTRE LES PARASITES</u></b>	<b>14</b>
2.1.	<u>Travaux d'immunisation menés sur les tiques</u>	15
2.1.1.	<u>Essais d'immunisation à partir de glandes salivaires</u>	15
2.1.2.	<u>Essais d'immunisation à partir d'autres tissus de tiques</u>	16
2.1.3.	<u>Mise au point du vaccin contre <i>B. microplus</i></u>	19
2.1.3.1	<u>Etape 1</u>	19
2.1.3.2	<u>Etape 2</u>	20
2.1.3.3	<u>Etape 3</u>	21
2.1.3.4	<u>Etape 4</u>	22
2.1.3.5	<u>Et après ?...</u>	23
2.2.	<u>Travaux d'immunisation menés sur les insectes</u>	23
2.2.1.	<u>Essais d'immunisation contre les moustiques</u>	24
2.2.2.	<u>Essais d'immunisation contre les agents de myiases</u>	26
2.2.3.	<u>Essais d'immunisation contre les poux</u>	27
2.2.4.	<u>Essais d'immunisation contre les puces</u>	27
2.2.5.	<u>Essais d'immunisation contre les mouches piqueuses</u>	28
2.3.	<u>Travaux d'immunisation menés sur <i>Haemonchus contortus</i></u>	30
<b>3.</b>	<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b>33</b>

## Partie expérimentale

<b>1.</b>	<b><u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u></b>	<b>39</b>
1.1.	<u>Mouches</u>	39
1.2.	<u>Bovins</u>	42
1.3.	<u>Vaccins</u>	43

1.3.1.	Dissection des glossines :	43
1.3.2.	Préparation des antigènes :	43
<b>1.4.</b>	<b>Protocole d'immunisation</b>	<b>44</b>
1.4.1.	Challenge 0 des mouches, J0-J30	44
1.4.2.	Immunisation des bovins, J35-J65	44
1.4.3.	Challenges des mouches, J70-J125	44
1.4.3.1	J70-J105	44
1.4.3.2	J90-J125	44
<b>1.5.</b>	<b>Réalisation de western blots et d'ELISA</b>	<b>45</b>
1.5.1.	Electrophorèse	45
1.5.2.	Transfert sur membrane et révélation	45
1.5.3.	Sérologies	45
<b>1.6.</b>	<b>Méthodes statistiques d'exploitation des résultats</b>	<b>45</b>
1.6.1.	Test de l'écart réduit	46
1.6.2.	Test de Student	46
<b>2.</b>	<b>RÉSULTATS</b>	<b>47</b>
<b>2.1.</b>	<b>Challenge 0</b>	<b>47</b>
2.1.1.	Performances des 19 lots de mouches	47
2.1.2.	Elimination de 5 bovins en fonction des performances des lots de mouches	49
2.1.2.1	Bovin n° 5689	49
2.1.2.2	Bovin n° 5688	49
2.1.2.3	Bovin n° 5697	49
2.1.2.4	Bovin n° 1378	49
2.1.2.5	Bovin n° 1394	49
2.1.3.	Constitution des quatre groupes JJP, IJ, IP et T	49
2.1.3.1	Groupe Témoin :	50
2.1.3.2	Groupe JJP :	50
2.1.3.3	Groupe IJ :	50
2.1.3.4	Groupe IP :	50
2.1.4.	Résultats des différents groupes du challenge 0	50
2.1.4.1	Suivi du groupe T0	50
2.1.4.2	Suivi du groupe JJPO	50
2.1.4.3	Suivi du groupe IJO	51
2.1.4.4	Suivi du groupe IPO	51
2.1.4.5	Comparaison des moyennes des groupes du challenge 0	51
2.1.5.	Taux de mortalité	52
2.1.5.1	Groupe T0	52
2.1.5.2	Groupe JJPO	52
2.1.5.3	Groupe IJO	53
2.1.5.4	Groupe IPO	53
2.1.5.5	Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 0	54
2.1.6.	Cumul de ponte	54
2.1.7.	Taux de ponte	54
2.1.8.	Poids des pupes	55
<b>2.2.</b>	<b>Challenge 1</b>	<b>55</b>

<u>2.2.1.</u>	<u>Résultats</u>	55
<u>2.2.1.1</u>	<u>Suivi du groupe T1</u>	55
<u>2.2.1.2</u>	<u>Suivi du groupe JJP1</u>	56
<u>2.2.1.3</u>	<u>Suivi du groupe IJ1</u>	56
<u>2.2.1.4</u>	<u>Suivi du groupe IP1</u>	56
<u>2.2.1.5</u>	<u>Comparaison des moyennes des groupes du challenge 1</u>	57
<u>2.2.2.</u>	<u>Taux de mortalité</u>	57
<u>2.2.2.1</u>	<u>Groupe T1</u>	57
<u>2.2.2.2</u>	<u>Groupe JJP1</u>	58
<u>2.2.2.3</u>	<u>Groupe IJ1</u>	58
<u>2.2.2.4</u>	<u>Groupe IP1</u>	59
<u>2.2.2.5</u>	<u>Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 1</u>	60
<u>2.2.3.</u>	<u>Cumul de ponte</u>	60
<u>2.2.3.1</u>	<u>Groupe T1</u>	61
<u>2.2.3.2</u>	<u>Groupe JJP1</u>	61
<u>2.2.3.3</u>	<u>Groupe IJ1</u>	61
<u>2.2.3.4</u>	<u>Groupe IP1</u>	62
<u>2.2.3.5</u>	<u>Comparaison des moyennes des cumuls de pontes des groupes du challenge 1</u>	62
<u>2.2.4.</u>	<u>Taux de ponte</u>	63
<u>2.2.5.</u>	<u>Poids des pupes</u>	63
<b><u>2.3.</u></b>	<b><u>Challenge 2</u></b>	<b>63</b>
<u>2.3.1.</u>	<u>Résultats</u>	64
<u>2.3.1.1</u>	<u>Suivi du groupe T2</u>	64
<u>2.3.1.2</u>	<u>Suivi du groupe JJP2</u>	64
<u>2.3.1.3</u>	<u>Suivi du groupe IJ2</u>	65
<u>2.3.1.4</u>	<u>Suivi du groupe IP2</u>	65
<u>2.3.1.5</u>	<u>Comparaison des moyennes des groupes du challenge 2</u>	65
<u>2.3.2.</u>	<u>Taux de mortalité</u>	66
<u>2.3.2.1</u>	<u>Groupe T2</u>	66
<u>2.3.2.2</u>	<u>Groupe JJP2</u>	66
<u>2.3.2.3</u>	<u>Groupe IJ2</u>	67
<u>2.3.2.4</u>	<u>Groupe IP2</u>	67
<u>2.3.2.5</u>	<u>Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 2</u>	68
<u>2.3.3.</u>	<u>Cumul de ponte</u>	69
<u>2.3.3.1</u>	<u>Groupe T2</u>	69
<u>2.3.3.2</u>	<u>Groupe JJP2</u>	69
<u>2.3.3.3</u>	<u>Groupe IJ2</u>	70
<u>2.3.3.4</u>	<u>Groupe IP2</u>	70
<u>2.3.3.5</u>	<u>Comparaison des moyennes des cumuls de ponte des groupes du challenge 2</u>	71
<u>2.3.4.</u>	<u>Taux de ponte</u>	72
<u>2.3.5.</u>	<u>Poids des pupes</u>	72
<b><u>2.4.</u></b>	<b><u>Challenge horizontal</u></b>	<b>72</b>
<u>2.4.1.</u>	<u>Taux de mortalité à J30</u>	72
<u>2.4.1.1</u>	<u>Groupe T</u>	73
<u>2.4.1.2</u>	<u>Groupe JJP</u>	73
<u>2.4.1.3</u>	<u>Groupe IJ</u>	73
<u>2.4.1.4</u>	<u>Groupe IP</u>	74
<u>2.4.2.</u>	<u>Cumul de ponte</u>	74



2.4.2.1	Groupe T	74
2.4.2.2	Groupe JJP	75
2.4.2.3	Groupe IJ	75
2.4.2.4	Groupe IP	75
2.4.3.	Taux de ponte	76
2.4.3.1	Groupe T	76
2.4.3.2	Groupe JJP	77
2.4.3.3	Groupe IJ	77
2.4.3.4	Groupe IP	77
2.4.4.	Poids des pupes	78
2.4.4.1	Groupe T	78
2.4.4.2	Groupe JJP	78
2.4.4.3	Groupe IJ	79
2.4.4.4	Groupe IP	79
<b>2.2.</b>	<b>Distinction de deux groupes de bovins</b>	<b>79</b>
2.5.1.	Challenge 1	80
2.5.1.1	Taux de mortalité	80
2.5.1.2	Cumul de ponte	80
2.5.1.3	Taux de ponte	80
2.5.1.4	Poids moyen des pupes	80
2.5.2.	Challenge 2	81
2.5.2.1	Taux de mortalité	81
2.5.2.2	Cumul de ponte	81
2.5.2.3	Taux de ponte	81
2.5.2.4	Poids moyen des pupes	81
<b>2.3.</b>	<b>Sérologies et western blots</b>	<b>81</b>
2.5.1.	Sérologies	81
2.5.2.	Western blots	82
<b>3.</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>85</b>

**Annexes**

**Bibliographie**



Les trypanosomoses des mammifères sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*, parasites du sang.

La transmission du parasite à l'hôte définitif est assurée en général par un insecte hématophage, suite à un cycle plus ou moins complexe. En Afrique tropicale, les vecteurs principaux des trypanosomoses sont les glossines.

Les trypanosomoses touchent de nombreux mammifères, dont le bétail.

Les conséquences médicales et économiques de ces maladies sont particulièrement importantes. Les glossines constituent un facteur limitant de l'élevage en Afrique tropicale, dans des zones offrant pourtant un fort potentiel fourrager.

Le contrôle des trypanosomoses permettrait d'augmenter de manière conséquente les productions animales dans ces zones et de faire face au besoin alimentaire croissant en Afrique.

Actuellement, la stratégie privilégiée dans la lutte contre les trypanosomoses animales est d'associer le contrôle des vecteurs à une gestion raisonnée de la maladie. Dans ce cadre, les insecticides et les trypanocides restent à ce jour les moyens de lutte les plus utilisés.

Cependant, plusieurs arguments poussent les chercheurs à développer de nouvelles méthodes de lutte, non chimiques.

En premier lieu, l'association de différentes méthodes de lutte est a priori la garantie d'une plus grande efficacité.

Ensuite, le risque d'apparition de résistance des mouches tsé-tsé aux insecticides nécessite le développement de méthodes de lutte alternatives.

Enfin, les problèmes de rémanence de ces produits chimiques dans l'environnement ainsi que la présence de résidus dans les produits alimentaires d'origine animale sont de plus en plus pris en compte.

Parmi les techniques de lutte non chimiques, les possibilités d'exploiter les réponses immunologiques de l'hôte représentent un potentiel prometteur.

Des travaux de recherche sur le développement de vaccins contre les parasites doivent être menés. L'avancée de ces expérimentations dans d'autres modèles animaux permet d'espérer le succès d'une telle démarche.

Des essais d'immunisation de bovins contre *Glossina palpalis gambiensis*, à partir d'antigènes intestinaux de la glossine, ont été réalisés en 2001 au sein du CIRDES.

Les résultats montraient que pour certaines des fractions antigéniques utilisées, l'immunisation avait provoqué une augmentation de la mortalité et/ou une baisse des performances de reproduction. Ces résultats intéressants restaient

à confirmer, d'autant plus qu'au cours de l'expérience chacune des fractions antigéniques n'avait été inoculée qu'à un seul animal.

Le but de l'expérience présentée dans ce rapport est donc de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en 2001, en se basant sur un protocole similaire mais en utilisant plusieurs bovins par groupe.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. LES TRYPANOSOMOSES DU BETAIL

---

## 1.1. HISTORIQUE

Les trypanosomoses constituent un fléau majeur en zone tropicale, et ceci depuis très longtemps.

Des écrits anciens d'Ibn Khaldoun (1374-1375), concernant l'Empire du Mali, relatent des cas fatals de maladie du sommeil dans la cour du Sultan Mari Djata II.

Entre le XV<sup>ème</sup> et le XIX<sup>ème</sup> siècles, de nombreuses conquêtes et expéditions en zone humide sont freinées ou échouent, les chevaux des explorateurs succombant aux trypanosomoses transmises par les glossines présentes dans ces régions.

Il faut cependant attendre le XIX<sup>ème</sup> siècle pour que les parasites responsables de cette maladie ainsi que le rôle de vecteur des glossines soient découverts.

La première glossine (*Glossina longipalpis*) est décrite en 1830 par Christian Rudolph W. Wiedemann.

En 1880, Griffith Evans, officier vétérinaire de l'Armée des Indes, met en évidence *T. evansi* chez les chevaux et les chameaux du Pendjab.

En 1894, David Bruce, chirurgien major de l'Armée britannique, identifie *T. brucei* à la fois dans l'intestin des glossines et dans le sang des bovins malades et met ainsi en évidence le rôle de vecteur des glossines.

En 1908, le cycle détaillé du trypanosome chez la glossine est décrit par Roubaud.

A partir de 1916, le docteur Jamot développe des méthodes de lutte contre la maladie du sommeil.

## 1.2. DESCRIPTION DE LA MALADIE

Les trypanosomoses des mammifères sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*.

Ce sont des parasites du sang qui provoquent une maladie chronique (cas le plus fréquent chez le bétail) ou aiguë, dont l'issue peut être fatale en l'absence de thérapeutique. Cette maladie est appelée Nagana chez le bétail.

En revanche, la plupart des animaux sauvages et quelques races d'animaux domestiques sont peu affectés par la présence des parasites dans leurs organismes et bénéficient d'une trypanotolérance.

Trois espèces de trypanosomes sont responsables du Nagana. *T. congolense* est sans doute l'espèce la plus pathogène pour le bétail africain, suivie par *T. vivax*. *T. brucei* est quant à elle peu pathogène pour les animaux.

En Afrique tropicale, la transmission des trypanosomes aux animaux domestiques est principalement réalisée par l'intermédiaire d'un vecteur biologique.

Les vecteurs majeurs des trypanosomes sont les glossines, Diptères Brachycères Cyclorrhaphes de la famille des Glossinidae. Ce sont des mouches hématophages dans les deux sexes.



Les parasites accomplissent un cycle plus ou moins complexe dans l'organisme des glossines avant d'être à nouveau transmis, lors d'un repas de sang.

En général, toutes les glossines peuvent être vecteurs des trypanosomes. Cependant, en raison de leur distribution et de leur éthologie, certaines espèces sont plus fortement impliquées dans la transmission du Nagana. Ce sont surtout les espèces de savane, du groupe *morsitans*, ainsi que celles de galeries forestières, du groupe *palpalis*. Ces glossines se trouvent au croisement de cycles domestique et sauvage (cf. annexe 1).

### 1.3. CONSEQUENCES ECONOMIQUES

Soixante millions de bovins et 100 millions de petits ruminants sont exposés au risque trypanosomien.

Les pertes économiques relatives aux trypanosomoses s'élèveraient à plus d'1 milliard US\$. Le coût annuel des traitements trypanocides est de 30 millions US\$/an, ce qui représente 25 à 30 millions de doses.

Les trypanosomoses animales réduisent considérablement le nombre de têtes de bétail : de 37% en zone subhumide à 70% en zone humide.

La production de viande est réduite de 5 à 30%, la production laitière de 10 à 40% et celle de travail pour les bœufs de trait de 33%.

Les pertes dues à la morbidité (amaigrissement, baisse des performances de reproduction, aggravation des maladies intercurrentes...) sont plus difficiles à évaluer.

La production agricole totale serait réduite de 2 à 10% en zone à risque.

L'élevage est ainsi freiné en zone tropicale humide. La maîtrise de ce fléau permettrait de mieux exploiter 7 à 8 millions de kilomètres carrés offrant de fortes potentialités fourragères, et d'élever 33 millions de bovins supplémentaires pour faire face à l'augmentation rapide des besoins alimentaires de la population africaine.

### 1.4. METHODES DE LUTTE

Dans le cas des trypanosomoses animales, le réservoir domestique et sauvage est immense et incontrôlable. La stratégie de lutte est donc basée sur une action sur le vecteur, associée à une chimiothérapie à la demande et à une chimioprophylaxie du bétail, ainsi qu'à l'élevage de bétail trypanotolérant.

Une méthode ne peut à elle seule garantir une lutte efficace. Il s'agit d'utiliser conjointement plusieurs techniques, en essayant d'adapter cette association à chaque situation. Le choix d'un programme de lutte est difficile et doit prendre en compte de nombreux facteurs, dont entre autres les espèces de glossines impliquées et leur répartition, les conditions bioclimatiques et le type de végétation, aussi bien que la motivation et la capacité de financement des populations.

Dans cette optique, les scientifiques s'orientent vers la lutte intégrée, qui met en œuvre « un ensemble de méthodes et techniques de lutte satisfaisant aux exigences à la fois économiques, écologiques et toxicologiques, en réservant la priorité aux éléments naturels de limitation des populations et en respectant les seuils de tolérance » (P. Ferron).

Des progrès certains ont été réalisés en matière de lutte contre le vecteur. Bien qu'actuellement les insecticides restent les moyens de luttés les plus utilisés, d'autres techniques ont été développées ou sont en cours d'expérimentation. Ces méthodes ont pour but d'empêcher le développement des glossines par action directe ou indirecte sur leur natalité ou leur mortalité.

La lutte mécanique (piégeage), et/ou chimique (imprégnation d'écrans ou du bétail) ainsi que la lutte écologique (modification du biotope) sont déjà appliquées dans certaines zones.

Les méthodes de lutte biologique (régulateurs de croissance, etc.) sont séduisantes mais encore au stade de recherche pour la plupart.

La lutte génétique par lâchers de mâles stériles a donné des résultats encourageant.

Des travaux sur la sélection génétique de bovins trypanotolérants pourraient permettre de développer de nouvelles techniques efficaces.

Enfin, les méthodes exploitant les réponses immunologiques de l'hôte, comme les vaccins anti-parasite ou anti-maladie, en sont encore à leurs prémices alors qu'elles sont prometteuses.

Les chimioprophylaxie et -thérapie sont rendues délicates en raison du peu de produits chimiques disponibles et de la présence de résistances des parasites.

Cette constatation doit encourager la mise en application de méthodes de lutte alternatives.

Enfin, un autre aspect est à prendre en compte pour comprendre l'intérêt de développer des méthodes de lutte non chimiques.

L'opinion publique s'inquiète de plus en plus des conséquences des traitements chimiques. La rémanence des produits dans l'environnement, et la présence de résidus dans les produits alimentaires d'origine animale constituent des préoccupations importantes, du moins dans les pays développés. Parallèlement, la réglementation relative au développement et à l'utilisation d'insecticides s'est durcie et freine la mise sur le marché de nouveaux produits.

Face à cette situation, il devient nécessaire de mettre rapidement au point des techniques de lutte adaptées à ces nouvelles contraintes.

Il est tentant d'appliquer le principe d'immunisation des mammifères contre les arthropodes à la lutte contre les trypanosomoses. La vaccination du bétail contre les glossines, principaux vecteurs des trypanosomoses en Afrique tropicale, permettrait indirectement, et en association avec d'autres techniques de lutte, de diminuer la prévalence du Nagana.

Les travaux à entreprendre dans ce domaine doivent s'inspirer de ce qui a déjà été réalisé avec d'autres systèmes hôtes - parasites, et que nous allons évoquer à présent.



## 2. ESSAIS D'IMMUNISATION CONTRE LES PARASITES

---

Les méthodes immunologiques de lutte contre les vecteurs sont séduisantes.

L'emploi d'un vaccin anti-parasite a deux effets complémentaires. Il permet de diminuer les effets directs liés à l'infestation par le parasite. De plus, la transmission des maladies dont le parasite est le vecteur est enrayée par le maintien de la population de vecteurs à un seuil insuffisant pour assurer cette transmission de manière efficace.

Un vaccin anti-arthropode présente de nombreux avantages.

C'est une méthode alternative à l'emploi des insecticides ne présentant pas de risque pour l'environnement, et évitant la présence de résidus dans les produits alimentaires. La spécificité des espèces ciblées par un tel vaccin est également un bon atout, tout comme le risque limité de voir apparaître des résistances. Sa durée d'action potentielle est longue, son coût de fabrication ainsi que sa facilité d'administration sont des aspects importants à considérer en vue de la commercialisation d'un tel produit.

Le but d'un vaccin anti-parasite est de diriger la réponse immunitaire de l'hôte contre des antigènes parasitaires. Il existe deux sources potentielles d'antigènes vaccinaux : les antigènes conventionnels et les antigènes cachés.

Dans le premier cas, la cible est un antigène naturellement exposé aux effecteurs du système immunitaire de l'hôte, et il s'agit de mimer la réponse immunitaire intervenant lors d'une infestation parasitaire. Mais du fait des capacités d'adaptation des parasites à la réponse immunitaire de l'hôte, il se peut que cette réponse reste insuffisante.

La deuxième solution est de diriger la réponse immunitaire contre un antigène qui n'intervient normalement pas dans la réponse immunitaire, et qui correspond à une fonction physiologique importante. Dans le cas des parasites hématophages, les effecteurs du système immunitaire de l'hôte sont absorbés lors du repas sanguin et peuvent agir sur l'organisme du parasite. Les perturbations engendrées doivent avoir des conséquences suffisamment délétères pour qu'une telle approche soit possible.

L'évaluation du potentiel vaccinal des antigènes peut être réalisée grâce au suivi de la mortalité et des performances de reproduction des parasites, et éventuellement par l'observation d'effets délétères directs sur leurs tissus.

L'identification d'un antigène vaccinal efficace est le point de départ de la mise au point de ce type de vaccin. Les travaux menés par différentes équipes de recherche sur des parasites variés en sont à des stades très différents.

Les recherches les plus abouties à l'heure actuelle concernent les tiques. Les travaux indépendants des équipes de Davidson, Johnston, Kemp et Willadsen d'une part, et Penichet et Rodriguez d'autre part ont permis la commercialisation de vaccins contre *Boophilus microplus*, basés sur un antigène du tube digestif de la tique.

Les essais réalisés chez les insectes se sont révélés moins fructueux, ce qui ne signifie pas pour autant qu'il n'y ait pas d'espoir de vaccin pour eux. Les essais de mise au point d'un vaccin dirigé contre *Lucilia cuprina* sont prometteurs. Dans le cas des insectes hématophages, il faut accentuer les efforts sur l'emploi d'antigènes intestinaux et d'autres tissus internes comme cibles vaccinales.

Enfin, la démarche utilisée pour le développement d'un vaccin contre un nématode hématophage, *Haemonchus contortus*, est similaire et intéressante de considérer.

## 2.1. TRAVAUX D'IMMUNISATION MENES SUR LES TIQUES

Les travaux de recherche sur les vaccins anti-tiques ont commencé dès 1939 avec l'injection sous-cutanée d'extraits larvaires de *Dermacentor variabilis* à des cobayes (Trager, 1939). La résistance à l'infestation résultante a montré qu'une immunisation était possible, à partir de divers organes internes : glandes céphaliques, tube digestif, glandes salivaires.

De nombreux essais d'immunisation ont suivi, notamment à partir d'extraits de glandes salivaires. Mais des problèmes récurrents ont poussé les chercheurs à se tourner vers d'autres sources d'antigènes protecteurs. Cette nouvelle approche a permis le développement et la commercialisation du premier vaccin anti-parasite, TickGARD®.

### 2.1.1. Essais d'immunisation à partir de glandes salivaires

La vaccination avec des antigènes dérivés des glandes salivaires correspond à une tentative d'induction de résistance mimant la réponse immunitaire naturelle, acquise au cours d'infestations par les tiques. Plusieurs expériences utilisant les glandes salivaires comme source potentielle d'antigènes ont été réalisées, et la purification de ces antigènes a été plus rapide que pour les autres tissus.

Deux veaux de un jour ont été immunisés avec des antigènes de glandes salivaires de *B. microplus*. Cette immunisation a induit une production d'anticorps ainsi qu'une résistance à l'infestation (Brossard, 1976).

Des antigènes préparés à partir des glandes salivaires de femelles gorgées de *D. andersoni*, injectés par voie intradermique, ont provoqué une réponse immunitaire. Lors d'infestation expérimentale avec des tiques de la même espèce, une réduction significative du poids des tiques après gorgement ainsi que du nombre de larves ont été observées (Wikel, 1981).

Des veaux croisés *Bos taurus* X *Bos indicus* ont été immunisés par injection sous-cutanée d'antigènes de glandes salivaires de *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Trois fractions antigéniques ont été distinguées. La fraction I, fraction antigénique de glande salivaire totale, correspondait au surnageant de glandes homogénéisées et centrifugées. La fraction II était constituée du surnageant de glandes salivaires ayant subi des cycles de congélation - décongélation, puis homogénéisées et centrifugées. La dernière fraction antigénique, III, a été obtenue en resolubilisant le pellet de la fraction II. Les bovins immunisés ont subi des infestations expérimentales avec des tiques adultes de la même espèce. Les bovins ayant reçu la fraction I ont développé une réponse immunitaire à l'origine d'une augmentation significative du temps de gorgement, d'une diminution du poids des tiques gorgées, d'un allongement de la période pré-oviposition, d'une réduction du poids moyen des œufs et du nombre d'œufs pondus. Les tiques nourries sur les animaux immunisés avec la fraction II ont présenté un poids après gorgement plus faible que ceux des lots contrôles, leur période pré-oviposition a été allongée et le poids des œufs diminué. Les



performances des tiques nourries sur les bovins inoculés avec la fraction III étaient comparables à celles des tiques nourries sur les animaux contrôle (Banerjee et al., 1990).

Ces essais ont montré que l'immunisation à partir d'antigènes salivaires est possible.

Cependant, la protection conférée par ces antigènes n'est jamais très importante. Par ailleurs, deux problèmes majeurs sont retrouvés systématiquement : une grande variabilité de la réponse individuelle des animaux aux injections d'antigènes, et l'apparition de réactions d'hypersensibilité cutanée aux sites d'attachement des tiques.

Ces différents problèmes ont orienté les travaux vers la recherche d'un nouveau type d'antigènes protecteurs.

### 2.1.2. Essais d'immunisation à partir d'autres tissus de tiques

Les molécules qui ne sont pas introduites dans l'organisme de l'hôte lors du repas sanguin sont des candidats vaccinaux très séduisants. Un immunogène vaccinal doit pour autant être accessible aux effecteurs du système immunitaire de l'hôte. Une source évidente d'antigènes de ce type est le tractus digestif des tiques, puisqu'il entre en contact avec les éléments du système immunitaire de l'hôte ingérés lors du repas de sang. Cependant, les autres tissus de tiques ne doivent pas être éliminés, car les anticorps de l'hôte peuvent franchir la barrière digestive et sont détectables dans l'hémolymphe (Ackerman et al., 1981 ; Ben-Yakir, 1989, Wang et Nuttal, 1994)

Une immunité anti-tiques d'un bon niveau a été obtenue chez des cobayes immunisés à partir d'organes internes de *D. andersoni*. Le tube digestif et les organes reproducteurs de femelles gorgées de 5 jours ont constitué l'Antigène I. Tous les organes internes de tiques de même stade ont servi à la préparation de l'antigène II. Les cobayes ont reçu deux injections par voie sous-cutanée à 15 jours d'intervalle, puis ont été infestés expérimentalement par des tiques de la même espèce. L'immunisation avec l'Antigène I a provoqué une chute de ponte, et n'a pas permis l'éclosion de larves viables, celle avec l'Antigène II a empêché le gorgement des tiques et la production d'œufs (Allen et Humphreys, 1979). En revanche, la vaccination de bovins avec des immunogènes du tube digestif et d'organes reproducteurs de *D. andersoni* n'a pas induit une bonne immunité : le nombre de tiques gorgées n'a pas varié entre le lot témoin et les animaux vaccinés. Cependant, les tiques recueillies sur les bovins vaccinés sont plus petites, produisent moins d'œufs et moins de larves.

Des extraits de tissus d'appareils digestifs de *D. variabilis* mâles et femelles semi-gorgés ont été utilisés comme immunogènes. Les rats immunisés avec ces extraits ont été soumis à un challenge parasitaire. Les effets liés à la réponse immunitaire induite ont été variés : attachement retardé, baisse du poids des tiques gorgées, allongement de la période pré-oviposition, diminution du nombre d'éclosions (Ackerman et al., 1980).

Une autre expérience d'immunisation avec des extraits bruts d'adultes non gorgés de la même espèce a donné des résultats négatifs. Les animaux ont reçu des injections chaque semaine pendant trois semaines. Lors de l'infestation expérimentale, aucune différence de période de gorgement et de poids des tiques gorgées n'a été constatée entre les lots témoins et les lots nourris sur les animaux vaccinés (Ackerman et al., 1980).

L'immunisation de bovins avec un homogénat d'adultes entiers de *Amblyomma americanum* à 3 et 18 mg/kg a provoqué une baisse du poids des femelles *A. americanum* gorgées. Lors d'une seconde infestation expérimentale, cette baisse a été accentuée. La possibilité d'une action synergique entre immunité vaccinale et immunité naturelle n'a pas été



explorée. L'effet d'augmentation de l'immunité engendrée par une infestation serait pourtant bénéfique pour un vaccin anti-tiques (McGowan et al., 1981).

Des gels d'immunodiffusion, où des antigènes de femelles entières de *Rhipicephalus appendiculatus* ont réagi avec des anticorps induits par immunisation avec des homogénats de tiques de la même espèce non gorgées, ont été à la base d'un essai réalisé sur des lapins. Les antigènes fixés par les anticorps ont été extraits des gels et injectés aux lapins, provoquant une résistance à l'infestation par *R. appendiculatus*. La durée du repas de sang des adultes a été augmentée, mais le poids final des tiques gorgées n'a pas été modifié par rapport aux lots témoins. Les anticorps ont ensuite permis la détection de candidats immunogènes présents dans l'homogénat de tiques, qui se sont révélés être en grand nombre (Mongi et al., 1986).

Des cobayes ont été immunisés à partir de fragments de la bordure en brosse d'intestins d'*A. americanum*. Un challenge avec des tiques adultes de la même espèce a ensuite été effectué. Les résultats montrent un poids des femelles gorgées réduit jusqu'à 69,8%, et la mortalité des tiques effectuant leur repas de sang sur des animaux vaccinés varie de 37,5 à 71,5%. Il a été remarqué que l'immunité anti-tiques a affecté les mâles et femelles alors que la fraction antigénique a été préparée uniquement à partir de femelles (Wikel, 1988).

Des homogénats de nymphes de *A. hebraeum* et *A. marmoreum* ont été obtenus par broyage, sonication, centrifugation et filtrage. Ils ont servi à immuniser des lapins. Les niveaux de résistance à l'infestation par les deux espèces de tiques ont été significatifs, comparés aux contrôles. En revanche, il n'a pas été constaté de résistance croisée (Tembo et Rechav, 1992).

Une résistance significative à l'infestation par tous les stades de *R. appendiculatus* est induite par immunisation de bovins à partir d'immunogènes solubles et partiellement purifiés de la membrane du tube digestif de femelles de la même espèce de tiques. Le nombre de tiques se nourrissant sur les animaux vaccinés n'est pas affecté, mais le poids des tiques gorgées est réduit. La viabilité des œufs est diminuée, cependant les tiques nourries sur les bovins immunisés pondent plus d'œufs (Essuman et al., 1991).

Des travaux ont cherché à comparer l'immunité acquise après infestation à celle induite par injection de protéines digestives solubilisées. Les effets sur le gorgement et les performances de reproductions sont plus importants lors d'immunisation vaccinale. La réduction de poids après gorgement la plus forte est observée lorsque l'immunisation vaccinale fait suite à deux infestations expérimentales.

Un vaccin commercial doit pouvoir être administré sans risque à des animaux préalablement exposés à des infestations par les tiques. Le fait que ces infestations naturelles augmentent le niveau d'immunité vaccinale est un bon atout pour le vaccin.

Les travaux de recherche menés par Opdebeeck et ses collègues sur *B. microplus* sont intéressants.

L'immunisation de bovins avec des immunogènes du tractus digestif de *B. microplus* ou une combinaison d'antigènes du tube digestif et du synganglion (ganglion nerveux rostral) a permis une réduction de l'infestation de 87 et 80% respectivement. La production d'œufs a été diminuée de 95 et 91%. En revanche, l'immunisation à partir du synganglion seul n'est pas efficace. Bien que diminuant au cours du temps, la protection induite par la vaccination reste détectable pendant au moins 7 mois (Opdebeeck et al., 1988).

Des bovins et ovins ont été immunisés avec différentes concentrations d'antigènes de la membrane du tube digestif de *B. microplus*, et les réponses en anticorps correspondantes



ont été évaluées par ELISA. Les quantités totales d'immunogènes administrés variaient de 0,05 à 5000µg. L'immunisation avec 1µg d'antigène du tube digestif a induit une réponse en anticorps comparable à celle résultant de l'administration de 500µg du même extrait antigénique. Les bovins ont présenté une résistance à l'infestation de même niveau après 2 injections de 500µg ou 3 injections de 50µg ou 500µg d'antigène de la membrane du tube digestif. La protection, mesurée par la réduction du poids des œufs, était alors respectivement de 89%, 80% ou 95% pour ces trois groupes (Jackson et Opdebeeck, 1989).

Des épitopes associés aux membranes larvaires de *B. microplus* se sont avérés protecteurs. En effet, la production d'œufs de tiques nourries sur les animaux vaccinés avec des extraits de membrane larvaire a été réduite de 78% par rapport aux lots de contrôle. Les membranes larvaires solubilisées et les sera de bovins vaccinés avec des membranes de tubes digestifs ont été utilisés pour purifier par immunoaffinité des immunogènes potentiellement protecteurs. Les bovins immunisés avec ces derniers ont présenté une protection de 80 et 89%, dans deux expériences différentes (Wong et Opdebeeck, 1990).

Des travaux ont été menés sur les effecteurs de la réponse immunitaire induite lors d'immunisation. Il s'est avéré que la protection est alors positivement corrélée avec le titre en anticorps anti-tiques. La production post-immunisation d'immunoglobulines, particulièrement d'IgG1, est corrélée avec le développement de la protection. De plus, la fixation du complément est directement corrélée à l'induction de l'immunité anti-tiques. Par contre, les isotypes IgG2 et IgM ne sont pas corrélés avec la protection induite par immunisation (Jackson et Opdebeeck, 1990).

Un panel de 18 anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de la membrane du tube digestif de *B. microplus* ont été testés. Onze de ces anticorps ont précipité en présence des antigènes. Les composants du précipité Ac monoclonal QU13-tube digestif ont induit une résistance des bovins à l'infestation. Le matériel du précipité a été séparé par SDS-PAGE et coloré par imprégnation argentique, révélant des bandes de <30, 57, 62, 74, 80 et 200kDa. L'épitope réactif de QU13 a été retrouvé sur plusieurs molécules.

L'immunisation de bovins à partir d'immunogènes du tractus digestif de *B. microplus* a été efficace. Le pellet et le surnageant obtenus après centrifugation d'extraits de tubes digestifs ont été utilisés comme fractions antigéniques. Trois injections à J0, J14 et J42 ont provoqué des réponses en anticorps importantes. La protection contre les tiques a été mesurée par la moyenne du poids des œufs. Le pellet induit une protection de 91%, les deux fractions mélangées sont à l'origine d'un niveau de protection de 82%, alors que les antigènes solubles seuls n'entraînent qu'une réduction de 33% du poids des œufs (Opdebeeck, 1994).

Les travaux de cette équipe de chercheurs n'ont malheureusement pas abouti à l'heure actuelle. Ils ont en revanche fourni des informations intéressantes sur les possibilités d'immunisation à partir de tissus de tiques ainsi que sur les effecteurs de la réponse immunitaire induite.

Les expériences menées à partir d'antigènes provenant de différents organes internes de tiques ont donné des résultats variables. Les antigènes à l'origine des meilleures protections anti-tiques sont les antigènes du tractus digestif, suivis par ceux des organes reproducteurs et les protéines vitellines. L'immunisation à partir de ces antigènes est à l'origine d'une certaine mortalité, mais surtout d'une baisse des performances de reproduction des tiques.

Il n'y a pas eu de publication sur la purification et l'identification d'antigènes protecteurs, si l'on excepte le cas de *B. microplus*. C'est d'autant plus surprenant que les tiques constituent un groupe assez homogène, et que *B. microplus* ne doit pas être la seule espèce à pouvoir être sensible à ce type de vaccin. Cependant, les caractères monoxène et monotrope de cette espèce favorisent les contacts répétés entre l'hôte et le parasite et



rassemblent ainsi des conditions plus propices pour le vaccin que dans les espèces de tiques possédant plusieurs hôtes.

Des efforts importants ont été consacrés à *B. microplus* et ont permis le développement de deux vaccins commerciaux, comme nous allons maintenant le voir. Ces efforts doivent désormais être orientés vers les autres espèces de tiques ayant des conséquences économiques non négligeables.

### 2.1.3. Mise au point du vaccin contre *B. microplus*

Le vaccin contre *B. microplus* tel qu'il est commercialisé à l'heure actuelle (TickGARD®) contient un unique antigène recombinant en suspension dans un adjuvant huileux. L'antigène protecteur, Bm86 (Willadsen et Kemp, 1988, Tellam et al., 1992, Willadsen et al., 1989) est une glycoprotéine membranaire localisée à la surface des cellules du tube digestif de la tique (Gough et Kemp, 1993).

L'ingestion d'anticorps anti-Bm86, produits par les bovins vaccinés, a lieu au cours du repas de sang. La fixation de ces anticorps sur la surface des cellules digestives de la tique est suivie par la lyse de ces cellules et la fuite de matériel du tube digestif dans l'hémolymphe. Le mécanisme de cette lyse n'est pas encore élucidé. Ces séries de réactions provoquent une certaine mortalité au moment du gorgement mais surtout entre le repas de sang et l'oviposition, ce qui est à l'origine d'une réduction de la population parasitaire.

Il a fallu 13 ans pour développer ce nouveau produit. En résumé, on peut distinguer 4 étapes principales :

- 1) démonstration de la faisabilité du vaccin en conditions contrôlées (immunisation contre les tiques, identification de l'antigène protecteur, production d'une protéine recombinante efficace).
- 2) démonstration que le vaccin procure une protection suffisante contre les tiques sur le terrain.
- 3) enregistrement du produit (efficacité, sécurité, innocuité, propriétés du produit).
- 4) introduction du nouveau produit dans la filière bovine.

#### 2.1.3.1 Etape 1

Des expériences menées en 1986 ont abouti à la production d'anticorps ayant des conséquences délétères sur les organes internes du parasite.

La vaccination de bovin *Bos taurus* et *Bos taurus* X *Bos indicus* avec des extraits de femelles adultes semi-gorgées de *B. microplus* a induit une immunité, mais de niveau très variable (Johnston et al, 1986). La résistance induite par l'immunisation était encore évidente après 14 jours de challenge quotidien avec 1000 larves. La charge parasitaire sur les bovins vaccinés a été réduite de 70% par rapport aux contrôles. Le niveau d'anticorps anti-extrait de tiques des animaux vaccinés n'est pas corrélé avec la résistance aux tiques.

Plusieurs dommages internes ont été observés sur les tiques prélevées sur les animaux vaccinés : rupture du tube digestif, présence de sang dans l'hémolymphe (Agbede et Kemp, 1986). Les leucocytes bovins, qui ont gagné l'hémolymphe, ont provoqué des dommages au niveau des muscles et des tubes de Malpighi, mais pas au niveau des glandes salivaires. Il a été remarqué que les effets étaient plus importants sur les adultes que sur les larves, et que les lésions apparaissaient à la fin du repas sanguin. L'explication de ces observations serait que l'accumulation d'une grande quantité d'anticorps est nécessaire pour entraîner des effets délétères.

Suite à une série de fractionnements, vaccinations et challenges parasitaires, un composant mineur de la membrane de *B. microplus* a été identifié comme protecteur. Il a été appelé Bm86. Il s'agit d'un antigène caché, autrement dit un immunogène normalement non introduit dans l'hôte au cours du repas de sang. Cependant, il est exposé aux effecteurs du système immunitaire de l'hôte ingérés lors du repas de sang (Willadsen and Kemp, 1988).

L'antigène protecteur, Bm86, a été purifié et caractérisé comme une glycoprotéine de poids moléculaire de 89kDa et de point isoélectrique de 5,1 à 5,6. Cette molécule a été immunolocalisée au niveau de la surface des cellules digestives. La séquençage et la description de la structure de cet antigène ont également été effectués (Willadsen et al., 1989 ; Rand et al., 1989 ; Cobon et Willadsen, 1990 ; Tellam et al., 1992). Des techniques d'immunohistochimie ont permis de montrer que l'antigène Bm86 est conservé dans de nombreuses souches de *B. microplus* (Penichet et al., 1994).

Plusieurs systèmes d'expression ont été testés pour produire une protéine recombinante protectrice : systèmes bactériens, fongiques et de cellules d'insectes. Les 1ers essais de protéines recombinantes ont conféré une protection, mais beaucoup moins bonne qu'avec la protéine native (Rand et al., 1989). On a ensuite assisté au développement de systèmes d'expression basés sur *E.coli* et des baculovirus, et de modifications post-transcriptionnelles. Les produits finaux obtenus par ces méthodes ont présenté une efficacité comparable à celle de l'antigène natif (Tellam et al., 1992).

L'évaluation de l'efficacité du vaccin a été faite grâce à un modèle standardisé : des bovins naïfs, jamais exposés aux tiques, ont été infestés avec 1000 larves de *B. microplus* par jour. Les effets ont été mesurés expérimentalement 21 jours plus tard par la réduction de la charge parasitaire et du poids des tiques gorgées, ainsi qu'une forte inhibition de la ponte chez les femelles adultes gorgées qui ont survécu. L'effet cumulé de la vaccination a été mesuré en pratique par la réduction du taux de ponte suivant un challenge larvaire standardisé, et cela résume les effets du vaccin sur le cycle de vie du parasite.

Les résultats obtenus avec les antigènes produits par *E. coli* lors d'essais en milieu contrôlé sont les suivants. Le nombre de tiques gorgées a été réduit de 20 à 30%, le poids des tiques gorgées de 30%, le poids des œufs pondus par gramme de femelle gorgée de 60 à 80%. Si l'impact du vaccin est mesuré par son effet sur les capacités de reproduction d'une génération de tiques, depuis les larves jusqu'aux œufs pondus par femelles adultes survivantes, alors les paramètres cités donnent un effet global de 90% (Tellam et al, 1992).

#### 2.1.3.2 Etape 2

Les premiers essais en conditions naturelles ont été réalisés en 1990-1991.

Les animaux immunisés étaient des bovins Hereford de 10 à 12 mois, ayant préalablement été exposés aux tiques et possédant donc une immunité naturelle acquise. Ces bovins ont subi des infestations artificielles avec 20 000 larves. Le comptage des femelles gorgées a permis de classer les bovins en fonction de leur niveau d'immunité naturelle acquise. Quatre lots comparables ont été constitués par tirage au sort aléatoire, et ont été placés sur 4 pâtures sur lesquelles le nombre de larve de tiques était comparable.

Un premier groupe n'a pas été vacciné, un groupe a reçu une première injection et un rappel à la 7<sup>ème</sup> semaine, deux groupes ont reçu une injection suivie de deux rappels, aux 7<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> semaines.



Les conditions et le poids des bovins ont été contrôlés. La charge parasitaire des animaux a été suivie, et des prélèvements réguliers de tiques ont été effectués pour mesurer leurs capacités de reproduction.

Les résultats (graphes à fournir) témoignent du potentiel du vaccin pour contrôler les populations de tiques. Cette expérience a également mis en évidence la difficulté de réaliser des expériences de terrain, car de nombreux événements non contrôlés se produisent et constituent des biais. Ainsi, la météorologie et son impact sur les populations de tiques ou le retrait des animaux contrôlés trop affectés influencent les résultats de cet essai. Cependant, la capacité du vaccin de réduire de manière significative la charge parasitaire est nette. La mesure du poids des bovins a permis d'illustrer le bénéfice résultant du contrôle des tiques (Willadsen et al., 1991)

D'autres essais en milieu naturel ont donné des résultats similaires (Rodriguez et al., 1993).

### 2.1.3.3 Etape 3

Cette étape correspond à l'enregistrement du produit en vue de sa commercialisation.

L'équipe de chercheurs qui a travaillé sur le vaccin anti-*B. microplus* a rencontré des difficultés pour définir ses effets et les bénéfices pour la production bovine.

En effet, le principal effet du vaccin est la réduction du rendement de la population de tiques. Les bénéfices à l'échelle individuelle sont donc faibles pour les bovins. A l'échelle du troupeau, ils sont liés à la réduction de la population de larves capables d'infester les troupeaux, et n'apparaissent qu'après une génération de tiques. Cela implique de plus que l'ensemble du troupeau soit vacciné et qu'il n'y ait pas introduction de nouveaux individus non immunisés. Ces différents éléments ont été importants à considérer lors du processus d'enregistrement du produit.

Le produit n'a pas pu être enregistré comme un vaccin réduisant la population de tiques sur les bovins de manière significative au cours d'une saison. Les essais demandés pour apporter la preuve de ces effets auraient été trop nombreux et beaucoup trop coûteux. La description du produit a donc été transformée en vaccin basé sur une réduction progressive de la population de tiques, en conséquence de la baisse de fécondité qu'il entraîne, un vaccin pour bovins permettant d'aider au contrôle des tiques du bétail sur les pâtures. Les effets ont pu être évalués grâce au nombre d'œufs pondus par femelle ayant survécu, à partir d'échantillons prélevés sur des bovins. De plus, la corrélation inverse entre le poids des œufs pondus et le titre en anticorps anti-Bm86 a également pu être exploitée.

L'efficacité générale de la vaccination, seule ou combinée à des traitements acaricides raisonnés, a été mesurée par 16 essais sur plus de 3500 bovins. Ces essais ont démontré qu'un programme de vaccination correctement établi permettait d'augmenter les bénéfices des producteurs bovins.

La durée minimale de protection a été évaluée à 2 mois. Dans de nombreux troupeaux, des titres en anticorps ont persisté plus longtemps.

Le vaccin a été testé sur plusieurs souches de *B. microplus*, provenant de différentes régions, et avec des résistances aux pesticides variables. Il a été montré qu'il n'y a pas de corrélation entre la sensibilité des tiques aux vaccins et l'origine géographique de la souche ou son niveau de résistance aux acaricides.

D'autres propriétés du vaccin ont été vérifiées.

Le vaccin peut être conservé entre 2 et 8°C pendant au moins 3 ans sans être altéré.

Le vaccin est constitué d'une protéine stérile hautement purifiée dans un adjuvant huileux. Il a été vérifié que la vaccination des jeunes animaux n'entraînait pas d'effet

indésirable. L'absence d'effet négatif sur la reproduction lors de vaccination de génisses ou de vaches gestantes a été confirmée. L'administration de plus de 20 fois la dose recommandée n'a pas eu de conséquence néfaste. On n'a pas observé d'interaction avec d'autres produits utilisés en production animale, notamment avec les pesticides.

Il a été remarqué que des réactions au site d'injection pouvaient être observées et étaient dues à l'adjuvant huileux. Ces réactions étaient transitoires et n'affectaient pas la croissance de l'animal, la carcasse de l'animal n'était pas dévaluée non plus. Ces réactions sont apparues chez moins de 1% des bovins vaccinés. Il existe une corrélation positive entre la taille de la réaction observée et le titre en anticorps anti-Bm86. Le mode d'administration recommandé est l'injection sous-cutanée dans le cou.

#### 2.1.3.4 Etape 4

Le vaccin TickGARD® a été commercialisé en Australie en 1994. Son usage a été encouragé par de nombreuses organisations de producteurs, notamment les groupements laitiers. Son introduction a été accompagnée d'un intense effort de formation pour s'assurer que les capacités et modes d'action du vaccin avaient été bien compris.

Tout traitement en vue du contrôle des tiques est plus efficace s'il est employé de manière stratégique, pour éviter la constitution de fortes populations de tiques sur les pâtures. Ceci est vrai pour l'usage des produits chimiques, et encore plus dans le cas de vaccins anti-tiques.

En effet, le principal effet de ce vaccin est de réduire la capacité de reproduction des femelles gorgées, et donc réduire la population de tiques sur plusieurs générations. De plus, il faut un certain délai après la vaccination pour générer un pic de production d'anticorps. Ces deux raisons expliquent combien la stratégie vaccinale est essentielle. Pour les mêmes raisons, l'introduction continue de tiques ou de bovins infestés dans un troupeau d'animaux vaccinés est hautement indésirable.

Il a été montré sur le terrain que lorsque la vaccination est faite de manière appropriée et les animaux protégés contre une ré-infestation continue, alors une longue et efficace période de contrôle des tiques peut être obtenue (Willadsen et al., 1995).

En pratique, l'emploi du vaccin doit être adapté aux autres pratiques d'élevages. Il n'est pas toujours possible de vacciner les animaux au moment le plus opportun. C'est pourquoi il est recommandé que des animaux fortement infestés devant recevoir le vaccin soient traités simultanément avec un acaricide. Ceci de manière à maintenir la population de tiques sous contrôle jusqu'à ce que la vaccination soit effective, tout en permettant un usage réduit de produits chimiques.

Après plusieurs années d'utilisation en Australie, les producteurs ont adopté ce mode de contrôle, qu'ils trouvent intéressant (Cobon et al., 1995). Un sondage auprès des producteurs, après la première saison d'utilisation, a indiqué un pourcentage important d'acceptation du vaccin. Les industries laitières du Queensland ont même mis en place un programme de lutte contre les tiques, TickCON, associant la vaccination à un usage limité des acaricides.

En 1996, une nouvelle version du vaccin est sortie, avec un produit amélioré grâce à des modifications de la formulation de l'adjuvant, sous le nom TickGARD Plus®. Ce produit entraîne des titres en anticorps 2 à 3 fois plus élevés dans les troupeaux et a un effet plus fort et plus durable sur le contrôle des tiques.

La publication des travaux des équipes australiennes a permis le développement et la commercialisation d'une version cubaine du vaccin anti-*B. microplus*, dénommée Gavac®.



### 2.1.3.5 Et après ?...

Les chercheurs ont poursuivi leurs travaux pour améliorer leur produit.

D'autres antigènes ont été identifiés à partir de *B. microplus* mais aucun ne semble aussi efficace que Bm86. En revanche, ces antigènes protecteurs peuvent être associés à Bm86 pour augmenter l'efficacité du vaccin. C'est le cas de Bm95, une glycoprotéine de 86kDa, de point isoélectrique 4,8 à 5,2, localisé de manière prédominante dans les glandes salivaires et le tube digestif de *B. microplus* (Riding et al, 1994). Des données partielles sur la séquence d'acides aminés de cet immunogène montrent une homologie avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine des mammifères. Les infestations naturelles avec *B. microplus* n'induisent pas la production d'anticorps contre cet immunogène, qui est donc un antigène caché.

Il est tentant d'étendre ce vaccin à d'autres tiques.

Comme nous l'avons vu, de nombreuses expériences ont montré que l'immunisation contre les parasites est possible. Mais les chercheurs rencontrent des difficultés à purifier les antigènes, et le coût des expériences menées sur des animaux domestiques est important. C'est pourquoi il serait intéressant de développer de nouveaux vaccins non pas à partir de nouvelles molécules mais par extension à partir d'antigènes protecteurs connus dans d'autres espèces. Il s'agit alors d'identifier des antigènes provoquant des réactions immunologiques croisées, des antigènes avec des fonctions homologues ou encore des antigènes présentant des séquences d'ADN ou d'acides aminés identiques.

Mais là encore, les équipes de recherches se heurtent à des problèmes.

Les réactions croisées entre des antigènes sont fréquemment rapportées, mais la protection croisée est beaucoup moins fréquente. Les réactions croisées observées sont probablement dues à des épitopes communs non protecteurs.

Il faut connaître la fonction biochimique des antigènes pour 2<sup>ème</sup> approche. C'est rarement le cas et malheureusement, la fonction de Bm86 n'a pas été élucidée à l'heure actuelle.

Il reste l'exploitation de séquences conservées entre espèces. Dans le cas de Bm86, un segment d'environ 450pb montre 85% d'homologie entre *B. microplus* et *R. appendiculatus*. C'est sans doute un bon candidat, et des études approfondies doivent être entreprises en ce sens.

## 2.2. TRAVAUX D'IMMUNISATION MENES SUR LES INSECTES

Un certain nombre d'essais d'immunisation ont été menés sur différentes espèces d'insectes. Dans ces tests, les antigènes utilisés ont été préparés à partir d'extraits d'insectes entiers ou d'organes (glandes salivaires, tube digestif...), après dissection et/ou macération. La plupart des essais ont été réalisés sur des animaux de laboratoire, parfois éloignés des espèces impliquées dans le système hôte - parasite naturel.

Les immunisations confèrent dans la plupart des cas une protection comprise entre 0 et 50%. Cela se traduit par une augmentation de la mortalité ou une diminution des capacités de reproduction.



Plusieurs arguments peuvent expliquer ces résultats moindres par rapport à ceux obtenus chez les tiques.

Il a été supposé dans un premier temps que ces échecs relatifs étaient dus à la nature du parasitisme des insectes, les contacts intermittents réduisant les possibilités d'immunisation des hôtes.

Une autre théorie a ensuite été proposée. Chez les insectes, la digestion a lieu dans la lumière du tube digestif, alors qu'elle est intracellulaire chez les tiques. De plus, les enzymes digestives secrétées sont soit neutres, soit acides, et le pH intestinal doit probablement être à l'origine d'une partie de la destruction des anticorps. Enfin, la membrane péritrophique des insectes préserve les cellules de l'épithélium digestif du contact direct avec le contenu du tube digestif. Ces différences de physiologie de la digestion laissent croire que chez les Insectes, les antigènes vaccinaux entrent moins facilement en contact avec l'organisme de l'hôte et donc induisent moins facilement une réponse immunitaire.

### 2.2.1. Essais d'immunisation contre les moustiques

C'est sur les moustiques que le plus d'expériences ont été tentées. Les résultats obtenus sont variables, les effets concernent soit la mortalité soit les performances de reproduction, et les niveaux de protection induits ne sont pas aussi importants qu'on aurait pu l'espérer.

Des homogénats d'*Anopheles quadrimaculatus* ont été administrés par voie sous-cutanée à des lapins. Deux fractions antigéniques ont été distinguées. L'antigène I est constitué d'un homogénat de femelles entières de moustiques. L'antigène II correspond lui à un extrait du premier antigène obtenu après une série de congélations - décongélations et filtrage. Les lapins ont ensuite été soumis à des challenges parasitaires de 5 minutes. Les moustiques ont été tués après avoir été récupérés sur les hôtes, et observés au microscope (Dubin et al., 1948). Il n'a malheureusement pas été fait d'évaluation de la viabilité post-gorgement, pas plus que de la fécondité. On peut penser que l'influence des anticorps anti-moustiques est sans doute négligeable après seulement quelques minutes de repas sanguin.

Une expérience menée par Alger et Cabrera (1972) montre qu'une certaine immunité anti-moustique peut être induite. Des lapins ont été immunisés avec des broyats de tissus d'*Anopheles stephensi*. Trois fractions antigéniques ont été utilisées : (i) surnageant de moustiques entiers broyés et centrifugés ; (ii) pellet de moustiques entiers broyés et centrifugés ; (iii) intestins de moustiques homogénéisés. Ces trois fractions ont été préparées à partir de femelles de moustiques de 7 à 10j, nourries sur dextrose. Après infestation expérimentale, il a été constaté que le taux de mortalité des moustiques nourris sur les lapins immunisés avec l'antigène (iii) a été significativement augmenté par rapport aux autres groupes (contrôle, i et ii).

Une immunisation de lapins et de cobayes a été tentée avec un homogénat de *Aedes aegypti* nourris sur sucre. Des challenges parasitaires avec *A. aegypti* et *Culex tarsalis* ont ensuite été effectués. Les observations faites sur les animaux immunisés sont les suivantes : abreuvement, alimentation, miction et défécation ont été interrompus dans les 48h qui ont suivi la première injection, et le sont restés pendant 6 à 10j. Les lapins ont guéri, 1 cobaye est mort avant le challenge parasitaire, le 2<sup>ème</sup> après. Les animaux du lot contrôle n'ont pas été affectés. L'influence de ces réactions sur les tests qui ont suivi n'a pas été déterminée. La fécondité de *A. aegypti* a été réduite de 24% pour les lots nourris sur cobayes et de 31% pour ceux gorgés sur des lapins. La mortalité n'a pas été affectée.



Deux lapins ont subi un rappel vaccinal et ont été soumis à une nouvelle infestation expérimentale. La production d'œufs des moustiques nourris sur ces animaux a été réduite.

La réponse anti-moustique n'était plus évidente 10 jours plus tard. La fécondité des moustiques nourris sur les lapins immunisés était meilleure que celle des lots contrôles. Cette absence de réponse a été attribuée à une baisse des titres en anticorps anti-moustiques, descendant sous leur seuil d'efficacité.

Aucune immunité croisée n'a été obtenue : la fécondité et la viabilité de *C. tarsalis* n'ont pas été affectées par les anticorps anti-*Aedes aegypti* (Sutherland et Ewen, 1974).

Des immunogènes de moustiques ont induit une production d'anticorps anti-moustiques, réduisant la fécondité et la viabilité des lots d'*A. aegypti* nourris sur les lapins vaccinés. Des moustiques ont été nourris pendant 24h avant d'être disséqués pour fabriquer 3 fractions antigéniques. Les organes utilisés sont : pour l'antigène(i), la tête et le thorax ; pour l'antigène (ii), les intestins ; et pour l'antigène (iii), le reste de l'abdomen. Les lapins ont été immunisés par 8 injections à 3 ou 4 semaines d'intervalle. Les anticorps anti-moustiques des sérums ont été détectés par immunodiffusion 10 jours après la 5<sup>ème</sup> immunisation. Il est probable qu'une méthode plus sensible aurait permis une détection plus rapide.

Aucune différence de mortalité n'a été observée entre les lots immunisés et les lots contrôles. La fécondité réduite chez les moustiques nourris sur un des lapins immunisés avec (i), 2 lapins immunisés avec (ii) et 1 lapin immunisé avec (iii). Une technique d'immunofluorescence a permis de localiser des anticorps ou fragments d'anticorps associés aux oocytes, chez les moustiques nourris sur les lapins immunisés (Ramasamy et al., 1988).

La même équipe a réalisé un autre essai sur deux autres espèces de moustiques. Les mêmes organes que dans l'expérience précédente ont été prélevés sur *Anopheles tessellatus* pour constituer trois fractions antigéniques similaires. Quatre injections intramusculaires à 3 ou 4 semaines d'intervalle ont permis le développement de titres en anticorps élevés chez des lapins.

Les résultats n'ont pas montré de différence significative de mortalité entre les différents lots, 48h après repas de sang. Les chercheurs ont noté une augmentation de la mortalité de *C. quinquefasciatus*, pour les lots nourris sur des animaux immunisés avec les fractions (i) et (ii).

La production d'œufs de *A. tessellatus* a été significativement réduite après exposition aux anticorps anti-moustiques. Des baisses de fécondité de 15% pour (i), 20% pour (ii) et 23% pour (iii), ont été constatées après ingestion de sang contenant des anticorps dirigés contre les antigènes de moustiques (Ramasamy et al., 1992).

Des équipes de chercheurs se sont consacrées à l'influence des anticorps dirigés contre le tractus digestif de moustiques sur le développement d'agents pathogènes dans le moustique.

Des anticorps anti-homogénat d'intestins de *An. stephensi* ont été testés pour leur capacité à altérer le développement de *Plasmodium berghei*, lorsque les anticorps et les parasites sont ingérés au cours du même repas de sang. Le taux d'infestation et le nombre d'oocytes de *P. berghei* ont été significativement réduits chez les moustiques nourris sur les animaux immunisés. Le taux d'infestation des glandes salivaires est de 42,9% sur les lots contrôles, entre J17 et J21 post infestation. En revanche, aucun sporozoïte n'a été détecté jusqu'à J29 dans les glandes salivaires de moustiques ayant ingéré des anticorps anti-intestins de moustiques (Lal et al., 1994).

Des anticorps anti-moustiques ont réduit le taux d'infestation de *An. farauti* par les stades oocytes de *P. berghei* (Ramasamy et Ramasamy, 1990). De plus, les anticorps anti-



intestins de moustiques ont réduit la sensibilité de *A. aegypti* aux arboviroses (Ramasamy et Ramasamy, 1990).

Plus récemment, des travaux menés par Lal (2001) ont confirmé cette tendance. Le principe de l'étude était d'immuniser les animaux avec des antigènes intestinaux auxquels les parasites sont exposés lors du développement sporogonique dans l'organisme de l'insecte. Des lysats de tube digestif de *A. gambiae* ont été inoculés et ont entraîné la production d'anticorps anti-intestin de moustique. Ces anticorps ont bloqué le développement de *P. falciparum* et de *P. vivax* dans 5 espèces différentes d'anophèles vectrices de paludisme, en réduisant considérablement la production d'oocytes et de sporozoïtes. Par ailleurs, le taux de ponte et la durée moyenne de survie des moustiques ont été diminués de manière significative. L'intérêt d'une telle immunisation est double puisqu'elle permet à la fois de réduire la compétence vectorielle et l'abondance du parasite vecteur de maladie.

Les immunogènes spécifiques et les modes d'actions par lesquels les anticorps anti-intestins de moustiques entravent le développement des pathogènes n'ont pas été identifiés. Cependant, ces résultats sont intéressants de considérer lorsque l'on envisage la lutte contre les arthropodes vecteurs de maladies. Un vaccin dirigé uniquement contre le vecteur ou un composant anti-vecteur introduit dans un vaccin dirigé contre 1 ou plusieurs pathogènes transmis par un arthropode donné, représente une nouvelle approche du contrôle des maladies transmises par arthropodes.

### 2.2.2. Essais d'immunisation contre les agents de myiases

Gingrich (1982) a montré que les bovins acquièrent une résistance lors d'infestations par *Hypoderma* spp. Cette résistance n'est pas corrélée aux anticorps anti-mouches, mais elle l'est à l'immunité à médiation cellulaire.

Des essais de vaccination de bovins contre *Hypoderma* spp ont provoqué l'augmentation *in vivo* de la mortalité des larves sur l'hôte (Khan et al., 1960).

L'Hypodermine A, purifiée à partir de larves L1 de la mouche, a induit le meilleur niveau de protection de longue durée (Pruett et al., 1987). Cette molécule est un bon candidat vaccinal, induisant des réponses humorale et cellulaire efficaces.

L'hypodermine A a été clonée et exprimée avec succès chez *E. coli* (Moire et al., 1994). Cette disponibilité d'hypodermine recombinante a ouvert la voie à l'usage de ces molécules comme immunogènes vaccinaux. Un développement en vue d'une commercialisation est en cours.

Plusieurs équipes ont travaillé sur *Lucilia cuprina*, espérant développer un vaccin contre cet important agent de myiase des ovins.

Le principe exploité dans ces travaux était que si les immunoglobulines ne pouvaient pas passer la membrane péritrophique, il fallait utiliser les protéines de cette dernière comme cibles d'une réponse immunitaire protectrice.

Une série de protéines ont été isolées à partir de la membrane péritrophique et ont induit une protection. Ce sont les péritrophines 95, 48, 44 et 30 (Tellam et al., 1992, 1994, Elvin et al., 1996). Ces antigènes ont des caractéristiques de protéines membranaires en milieu agressif : glycosylation importante et nombreux ponts di-sulfure, pour se protéger de la digestion protéolytique.

Ces immunogènes ont provoqué la production d'anticorps capables d'inhiber la croissance larvaire *in vivo* et *in vitro* (East et al., 1993). Bien que la mortalité des larves ait été augmentée *in vitro*, en augmentant les concentrations en anticorps, l'augmentation de la mortalité des larves n'a pas été significative *in vivo*.

En 1993, East et ses collègues ont mis au point un système de culture permettant de produire de la membrane péritrophique en grande quantité (de l'ordre du gramme), à partir de larves de *L. cuprina*. La membrane péritrophique ainsi obtenue a été utilisée pour immuniser des ovins. Une réponse immune a diminué de 50% le poids moyen des larves nourries sur les sérums des ovins vaccinés, par rapport aux contrôles.

Plus récemment (Tellam et al., 2003), une autre protéine, la péritrophine 55, a été isolée et purifiée à partir de la membrane péritrophique de larves de *L. cuprina*. Cet antigène injecté à des ovins a induit une réponse immunitaire, inhibant la croissance larvaire de 51 à 66% chez les larves nourries sur les sérums des animaux vaccinés. L'étude des propriétés de la péritrophine 55, et son séquençage, sont en cours, et permettront éventuellement la production d'une protéine recombinante.

Dans ces différentes expériences, l'effet de la vaccination est anticorps-dépendante. Il semble que la fixation des anticorps sur les antigènes de la membrane péritrophique forme une couche épaisse, amorphe et à peu près imperméable. Cela gênerait l'excrétion d'enzymes protéolytiques et l'absorption des produits de la digestion. L'effet résultant est un relatif état d'inanition, qui se traduit par un taux de croissance très réduit chez les larves nourries sur animaux vaccinés (Willadsen et al., 1993, Eisemann et Binnings, 1994).

L'effet de la vaccination est donc le résultat d'un compromis entre l'inhibition de la croissance due à la réponse immune, et les effets neutralisants de la production continue de membrane péritrophique et de la dégradation des anticorps par les protéinases sécrétées (Eisemann et al., 1993). C'est pour cela, et en raison de l'absence de progrès en matière de production de protéine recombinante, qu'un vaccin efficace ne peut être envisagé à l'heure actuelle.

### 2.2.3. Essais d'immunisation contre les poux

Des souris des souches Cox/Swiss et C3H/HeSN ont acquis une résistance à *Polyplax serrata* au bout de 50j d'infestation. La charge parasitaire lors d'une seconde infestation a été réduite de 78% et 98%, pour C3H/HeSN et Cox/Swiss, respectivement (Ratzlaff et Wikel, 1990).

La résistance murine à l'infestation par *P. serrata* a ensuite été induite par vaccination (Ratzlaff et Wikel, 1990). Les souris ont subi des injections sous-cutanées d'immunogènes de poux, à la base de la queue, pendant 6 jours. Les deux groupes contrôle ont reçu soit de l'albumine bovine, soit du PBS.

Le rapport charge parasitaire/ poids de l'hôte a été réduit de 62% chez les souris vaccinées avec l'immunogène de poux. La faible réduction de charge parasitaire dans le groupe vacciné avec l'albumine bovine est non significative. Les souris non immunisées ont exprimé leur résistance acquise en diminuant de 94% leur charge parasitaire lors d'une seconde infestation.

### 2.2.4. Essais d'immunisation contre les puces

Les puces sont d'importants vecteurs de maladies (Hoofstraal, 1980) et leurs piqûres provoquent des réactions d'hypersensibilité cutanée (Feingold et al., 1968), c'est pourquoi leur contrôle immunologique serait intéressant.

Cherney et al. (1939) rapportent que des personnes vaccinées avec préparation à base de puces entières ont été protégées contre les piqûres de puces.

Des immunogènes préparés à partir d'intestins de *Ctenocephalides felis felis* à jeun ont été utilisés pour vacciner des chats par voie sous-cutanée (Opdebeeck et Slacek, 1993).



Abattement, œdème, inflammation et fièvre ont été constatés et associés à l'emploi de l'adjuvant, remplacé par l'adjuvant de Ribí, qui n'a pas provoqué de réaction. Les chats vaccinés ont produit des anticorps anti-puces. Cependant, les résultats de cette expérience sont négatifs puisque aucune différence de charge parasitaire ou de fécondité n'a été observée entre les lots vaccinés et les témoins, suite aux six infestations expérimentales effectuées.

### 2.2.5. Essais d'immunisation contre les mouches piqueuses

Des travaux ont été réalisés sur des espèces importantes sur le plan économique et sanitaire chez le bétail. Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas été très convaincants.

Des lapins ont été immunisés avec différents tissus de *Stomoxys calcitrans* (Schlein et Lewis, 1976). Les 4 fractions antigéniques ont été obtenues par isolement et homogénéisation de (i) la cuticule et les cellules de l'hypoderme adhérentes, (ii) les muscles thoraciques, (iii) les tissus de l'abdomen et (iv) les bourgeons des ailes. Les lapins ont reçu 2 injections sous-cutanées à une semaine d'intervalle.

Après challenge parasitaire, il a été constaté que la mortalité était augmentée dans tous les lots de mouches nourris sur les groupes immunisés. La mortalité la plus forte est associée aux animaux immunisés avec l'extrait de muscles thoraciques.

Des paralysies des membres ou des ailes, ainsi que des difficultés à se nourrir ont été observées. Cet effet a été plus particulièrement remarqué sur les mouches nourries sur les lapins immunisés avec l'antigène (iv).

Des mouches de l'espèce *Glossina morsitans* ont été nourries sur des lapins immunisés avec les fractions antigéniques de *Stomoxys calcitrans* décrites ci-dessus (Schlein et Lewis, 1976). La mortalité s'est trouvée augmentée pour les mouches nourries sur les animaux immunisés avec (i) et (iv). Il est à noter que l'homogénat de bourgeons ailiers était majoritairement constitué de cuticule et de cellules hypodermiques.

Les anticorps ingérés lors du repas de sang ont apparemment profondément perturbé certains processus physiologiques des mouches.

Des travaux ont permis de conclure que les immunoglobulines des sérums franchissent la barrière digestive de *Sarcophaga falcitata* et de certaines espèces de moustiques, gagnant l'hémolymphe d'où elles peuvent rejoindre et affecter leurs tissus cibles (Schlein et al., 1976, Vaughan et Azad, 1988).

Otieno, Vundla et Mongi (1984) ont travaillé sur des mouches de l'espèce *Glossina morsitans morsitans*. Quatre lapins ont été immunisés avec des extraits bruts de protéases du tube digestif de tsé-tsé.

Les lots de mouches nourris sur les animaux vaccinés ont affiché une activité trypsine/protéase VI diminuée. Des problèmes de digestion du repas de sang ont été remarqués chez certaines mouches nourries sur les lapins immunisés : 6% des mouches n'arrivaient pas à vider leur jabot aussi facilement que les contrôles, et 7,8% sont restées jusqu'à 11j avec leur repas de sang non digéré. En revanche, il n'a pas été noté d'augmentation de la mortalité.

Kaaya et Alemu ont réalisé deux séries d'expériences sur des mouches tsé-tsé de la même espèce.

En 1982, ils ont décrit une baisse de fécondité et une augmentation de la mortalité des pupes, chez des *Glossina morsitans morsitans* maintenues sur des lapins immunisés avec différents antigènes de tsé-tsé.

En 1984, ils ont immunisé des lapins avec de la trypsine de tsé-tsé ou bovine. Ils ont constaté une augmentation significative de la mortalité chez les *Glossina morsitans morsitans* nourries pendant 45j sur les lapins vaccinés.

La baisse significative de la fécondité chez les mouches nourries sur les animaux immunisés avec trypsine bovine n'a pas été retrouvée dans les lots nourris sur les lapins vaccinés avec la trypsine de tsé-tsé, peut-être en raison de la différence de quantités d'antigènes injectées. Le poids des pupes des mouches nourries sur les lapins immunisés avec la trypsine de tsé-tsé ou bovine a été significativement diminué. Une technique d'immunodiffusion a mis en évidence des réactions croisées entre ces deux trypsines.

Des lapins ont été immunisés à partir d'éléments du tube digestif de *Glossina fuscipes fuscipes* (Desquesnes, 1990). Deux fractions antigéniques, obtenues à partir d'intestins ou de jabots homogénéisés de la glossine, ont été utilisées.

Le seul effet constaté a été une augmentation statistiquement significative de la mortalité hebdomadaire. L'immunisation des lapins n'a pas eu de conséquences sur les performances de reproduction des mouches.

Une étude a également été menée sur les tabanides (Desquesnes, 1997). Des broyats d'intestins moyens de taons à jeun (*T. occidentalis dorsovittatus*, *T. importunus*, *T. olivaceiventris*) ont été utilisés pour immuniser des bovins. De manière paradoxale, les résultats ont montré que l'immunisation a provoqué une augmentation de la durée moyenne de survie des femelles gorgées. L'hypothèse expliquant cet effet est que l'immunisation entraînerait un retard de digestion, permettant aux taons de disposer plus longtemps de nutriments, et donc allongerait leur durée moyenne de survie.

Ces résultats mitigés laissent peu d'espoir d'une lutte vaccinale contre les mouches piqueuses.

Les différentes expériences évoquées montrent bien que jusqu'ici, les tentatives d'immunisations contre les insectes ont eu assez peu de succès. Lorsqu'une immunité a pu être conférée, ses effets sont souvent insuffisants pour pouvoir envisager une lutte vaccinale. Si les recherches sur le sujet ne doivent pas être abandonnées, de nouvelles approches doivent être élaborées.

Des recherches prenant en compte l'expression différentielle de protéines au cours du repas de sang pourraient peut-être permettre d'identifier des candidats vaccinaux.

Il est par ailleurs nécessaire de mieux comprendre la réponse immunitaire de l'hôte lors d'infestation. Les antigènes induisant une forte réponse en anticorps ne sont pas forcément de bons candidats, et certaines des expériences illustrent ce problème. En revanche, les anticorps produits au cours d'une réponse immunitaire provoquant une nette diminution de l'infestation sont les témoins de la présence d'un antigène à fort potentiel vaccinal. En effet, cet antigène est présenté au système immunitaire et induit une réponse de l'organisme efficace.



## 2.3. TRAVAUX D'IMMUNISATION MENES SUR *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Les recherches menées sur *Haemonchus contortus* sont basées sur le même principe que les essais d'immunisation effectués sur les arthropodes, c'est pourquoi nous allons les évoquer ici.

En 1987, Munn et al. ont réalisé des essais d'immunisation avec une protéine de la surface des cellules du tube digestif d'*Haemonchus contortus*, appelée contortine. La protection induite chez les ovins vaccinés a permis de réduire de 78% la charge parasitaire et la production d'œufs de nématodes.

En 1993, Munn et al. ont utilisé d'autres immunogènes. L'extrait préparé a été obtenu à partir de nématodes adultes et enrichi en protéine H11 et en autres protéines de la membrane intestinale, mais exempt de contortine.

Son potentiel vaccinal a été évalué sur deux troupeaux d'ovins. Les injections ont été suivies par une infestation expérimentale avec 25000 larves infestantes. Dans un des troupeaux, le poids de vers retrouvés sur les animaux vaccinés a été réduit de 89%, et dans l'autre troupeau il a été diminué de 72%. Dans les deux cas, la réduction du nombre de femelles (92 et 72% respectivement) est plus importante que celle des mâles (86,5 et 46%). L'hypothèse avancée pour expliquer ce fait est que les femelles ingèrent une plus grande quantité de sang et donc d'anticorps. La quantité d'œufs pondus, évaluée seulement dans un des troupeaux, a été réduite de 92%.

La protection s'est révélée corrélée au titre en anticorps. La plupart de ces anticorps étaient dirigés contre la protéine H11. Il en a été déduit que l'effet protecteur était principalement dû à cet antigène.

Les niveaux de protection obtenus avec H11 ont été meilleurs que ceux obtenus avec la contortine. Que ce soit avec l'un ou l'autre de ces antigènes, la réduction du nombre d'œufs pondus est suffisante pour réduire significativement la contamination des pâtures.

Dans chaque troupeau, des variations individuelles de la réponse à l'infestation, et de niveau d'immunité induit par vaccination ont été constatés.

Des travaux menés par Smith (1993) ont permis d'approfondir ceux de Munn et al.

Ces travaux ont montré qu'une protection efficace pouvait être induite chez de jeunes animaux. C'est un constat intéressant car l'immunité acquise au cours d'infestations naturelles est longue à s'établir et une telle vaccination pourrait permettre de protéger les agneaux en attendant que leur immunité acquise se mette en place.

Une certaine immunité peut être transmise des brebis vaccinées aux agneaux, grâce aux anticorps présents dans le colostrum. De plus, des femelles gestantes immunisées ont subi un challenge parasitaire alors qu'elles étaient en état d'immunodépression physiologique. Leur excrétion fécale en œufs d'*H. contortus* a été réduite de 98%, témoignant d'un fort niveau de protection (Andrews et al., 1995, Newton et Munn, 1999, Smith, 1999)

Une expérience de transfert de sérum et une technique d'immunohistochimie ont mis en évidence le mécanisme effecteur de H11. Les anticorps du sérum se fixent sur la bordure en brosse des cellules du tube digestif, mais aucune lésion de la membrane intestinale n'a été observée. Il semble que l'accumulation des anticorps affecte le métabolisme digestif des vers, provoquant une réduction de la ponte. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la

protection est étroitement corrélée aux titres en anticorps (Andrews et al., 1997, Newton et Munn, 1999).

Les animaux ayant acquis une immunité au cours d'infestations naturelles ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre les protéines de la membrane intestinale, ce qui prouve que ces dernières n'entrent normalement pas en contact avec l'hôte. H11, et la contortine, sont des antigènes cachés (Newton et Munn, 1999, Smith, 1999)

De nouveaux essais ont permis d'identifier un antigène intéressant, appelé complexe H-gal-GP et distinguable des précédentes molécules identifiées (Smith et al., 1994). Après immunisation d'ovins, il permet une réduction de la charge parasitaire de 72% et du nombre moyen d'œufs par gramme de fèces de plus de 93%.

La surface intestinale des vers récupérés sur les animaux immunisés était recouverte d'immunoglobulines ovines, suggérant qu'ici aussi l'effet protecteur soit lié aux anticorps interférant avec les fonctions intestinales. Les molécules du complexe responsables de l'induction de la protection n'ont pas été identifiées.

D'autres molécules, induisant des niveaux variables de protection, ont été identifiées (Knox et al., 1993, Jasmer et al., 1993, Smith et al., 1993, Newton et Munn, 1999, Knox et Smith, 2001). Cependant H11 reste à ce jour l'antigène conférant la meilleure immunité aux animaux vaccinés.

Une nouvelle étape vers la mise au point d'un vaccin commercial a été l'étude de l'efficacité d'un vaccin expérimental en milieu naturel (Smith et al., 2001).

Un essai de 11 mois a été conduit en Afrique du Sud, sur des pâtures naturellement infestées par *H. contortus*. La mise en culture des populations larvaires a montré que plus de 97% de la contamination des pâtures était due à *H. contortus*.

Seize ovins ont été immunisés avec un vaccin expérimental enrichi en H11 et H-gal-GP. Sur 2 parcelles adjacentes, 2 lots constitués de 8 animaux vaccinés et de 8 témoins ont été suivis. Le comptage du nombre d'œufs de vers contenus dans les fèces et l'hématocrite ont permis d'estimer leur niveau d'infestation par *H. contortus*.

Les résultats montrent une bonne protection contre l'infestation en milieu naturel : la population parasitaire a été réduite jusqu'à 82%, et la gravité des signes cliniques a été moindre chez les animaux immunisés (hématocrites plus élevés, pas d'haemonchose aiguë potentiellement fatale).

Cependant, de nombreux défauts empêchent encore d'envisager un développement commercial. De nombreuses injections (J7, J27, J51 et J72) sont nécessaires pour obtenir une protection, et l'immunité conférée est de courte durée (7 mois environ). Ceci écarte le vaccin d'un usage à grande échelle, du fait des nombreuses manipulations nécessaires et du coût important des injections répétées.

Par ailleurs, à l'heure actuelle, les systèmes d'expression de protéines recombinantes sont peu efficaces. Les protéines H11 et H-gal-GP produites par *E.coli* se sont avérées non protectrices. Une version recombinante de H11 a été obtenue grâce à un système baculovirus (Smith et al., 1997). Enfin, des travaux sont menés sur un nématode libre, *Caenorhabditis elegans*. L'insertion du gène codant pour H-gal-GP devrait permettre de produire une protéine très proche de la protéine native (Redmond et al., 2001). La culture de ces vers étant aisée, cela pourrait être une bonne méthode pour obtenir l'antigène vaccinal en grandes quantités, en vue d'une commercialisation.

Les résultats obtenus laissent penser qu'en l'état, l'emploi d'un tel vaccin seul est insuffisant pour protéger efficacement des troupeaux. Cependant, il peut être intéressant



d'envisager son emploi à certaines période de forte sensibilité (jeunes, avant que l'immunité naturelle soit acquise, femelles gestantes physiologiquement immunodéprimées...).

Du fait du faible marché que représente la lutte contre *H. contortus*, il est souhaitable d'étendre la protection vaccinale à d'autres espèces de nématodes affectant le bétail.

Des essais d'immunisation à partir d'homologues de H11, H-gal-GP et un autre antigène protecteur ont été suivis par des challenges parasitaires avec *Ostertagia ostertagi* et *Teladorsagia circumcincta*. Les résultats ont été positifs, mais le niveau de protection induit est inférieur à celui obtenu contre *H. contortus* (Smith et al, 2000, Knox et al., 2001).

### 3. DISCUSSION

---

Les nombreux espoirs de développement de vaccin anti-arthropodes ont été fondés sur les récents progrès en biologie moléculaire.

De nombreux outils ont été exploités dans la recherche d'antigènes vaccinaux. Des techniques d'électrophorèse, d'immunoblotting ont permis d'isoler les molécules réagissant avec les anticorps des hôtes immunisés. D'autres outils ont permis d'obtenir des informations sur la taille, les sites actifs, la solubilité, la conformation, les modifications post-translationnelles et bien d'autres caractéristiques des antigènes sélectionnés. Des techniques d'isolation de gène, de clonage, de séquençage et des systèmes d'expressions ont permis d'obtenir des protéines recombinantes.

Dans un cas, l'application de ces outils de biologie moléculaire a abouti au développement commercial de deux vaccins anti-arthropode, TickGARD® et Gavac®. Quelques autres travaux de recherche sont en bonne voie, comme ceux menés sur *Haemonchus contortus* ou *Lucilia cuprina*.

Cependant, la majeure partie des expériences d'immunisation n'a pas eu de suite. De nombreux problèmes ont empêché l'avancement des travaux de recherche.  
(cf. tables de résumé des expériences d'immunisation)

C'est parfois dès l'étape d'identification d'antigènes protecteurs que les chercheurs ont échoué. Par exemple, lorsque les extraits utilisés n'ont pas conféré des niveaux de protection suffisants pour espérer une lutte vaccinale efficace. Un manque de connaissances sur les relations entre hôtes et parasites peut en partie expliquer ceci. Des études sur les mécanismes de la réponse immunitaires intervenant lors d'infestations pourraient fournir des informations utiles.

Dans d'autres cas, l'identification des antigènes protecteurs parmi les nombreuses protéines présentes dans les extraits bruts s'est avérée délicate.

Par ailleurs, les hôtes utilisés dans les essais d'immunisation sont souvent des animaux de laboratoires. Ces espèces sont éloignées de celles impliquées dans les systèmes hôtes - parasites ciblés, et il est possible que les mécanismes immunitaires mis en jeu par ces animaux soient différents de ceux des hôtes naturels. Cela pourrait signifier que les résultats obtenus lors de ces essais, qu'ils soient positifs ou négatifs, ne sont pas forcément un bon indicateur de la faisabilité du vaccin.

Une fois qu'un candidat vaccinal a été identifié, la production d'une protéine recombinante est nécessaire pour envisager un usage à grande échelle. Plusieurs équipes n'ont pas réussi à développer des systèmes d'expression permettant d'obtenir une protéine recombinante efficace. Il est possible que les différences de modifications post-translationnelles soient au moins en partie à l'origine de ces échecs.

Quelques expériences d'essais en conditions naturelles ont pu être menés. Cela implique d'avoir réussi à identifier un antigène protecteur et d'avoir pu produire une protéine recombinante efficace. Cela implique également d'avoir vérifié l'efficacité vaccinale en milieu contrôlé sur l'hôte naturel du parasite à partir duquel l'antigène a été isolé. La protection obtenue en conditions réelles est plus faible que celle en milieu contrôlé, car de nombreux autres facteurs interviennent. Il est possible que certains immunogènes protecteurs lors d'infestations contrôlées confèrent lors de ces essais en conditions naturelles une immunité insuffisante pour espérer l'employer sur le terrain.

En prenant du recul par rapport à ces travaux, on peut considérer qu'ils représentent un coût et une perte de temps considérable. De nouvelles approches ont été proposées, pour tenter de contrer ces difficultés (Dalton et Mulcahy, 2001, Willadsen, 2001).

Plutôt que de tenter d'identifier des protéines pour lesquelles des expériences ont montré leur potentiel protecteur, il pourrait être plus judicieux de s'intéresser aux protéines reliées à une fonction physiologique importante. Les outils de biologie moléculaire peuvent être employés pour chercher les gènes correspondants. La démarche inverse peut aussi être mise en œuvre : identification et isolement de gènes impliqués dans des fonctions vitales puis caractérisation de son produit.

Une autre stratégie possible est d'exploiter les acquis concernant certaines espèces, et de les étendre à d'autres. Les tentatives d'immunisation croisées ont jusqu'ici donné peu de résultats, et il est sans doute plus prometteur d'identifier des antigènes homologues que d'espérer isoler un seul antigène permettant d'immuniser les hôtes contre plusieurs arthropodes.

Deux possibilités sont à explorer : l'utilisation des fonctions homologues ou bien celle des séquences homologues.

Il faut dans un premier temps déterminer les fonctions biochimiques des antigènes protecteurs connus. On suppose que c'est le dysfonctionnement d'une fonction physiologique importante qui est à l'origine de l'effet délétère. Il s'agit donc ensuite de rechercher les protéines reliées à des fonctions homologues dans d'autres espèces.

En se basant sur le même principe, l'exploitation de séquences conservées entre espèces pourrait peut-être permettre d'isoler de bons candidats vaccinaux.

Malheureusement, à l'heure actuelle, les fonctions biochimiques des antigènes vaccinaux sont rarement connues, et peu d'études sur les séquences d'ADN homologues ont été menées.

Le développement de vaccins anti-arthropodes est-il aussi prometteur qu'il semblait l'être il y a quelques années ? Les difficultés rencontrées par les équipes de recherche, et les nombreuses incertitudes qui persistent permettent d'en douter.

Dans le cas appliqué à la lutte contre les trypanosomoses, les quelques expériences réalisées donnent des résultats décevants et font penser qu'une lutte vaccinale a peu de chance d'être développée. D'autres méthodes de lutte non chimiques laissent plus d'espoir, comme la sélection génétique de bovins résistants ou l'emploi de régulateurs de croissance en lutte biologique.



Figure 1 : tableau récapitulatif des essais d'immunisation

Equipe de chercheurs	Espèce immunisée	Parasite cible	Extrait utilisé pour l'immunisation	Résultats
Trager, 1939	Cobaye	<i>Dermacentor variabilis</i>	Extraits larvaires	Résistance à l'infestation
Alger et Cabrera, 1972	Lapin	<i>Anopheles stephensi</i>	Intestins de moustiques homogénéisés	Augmentation de la mortalité
Sutherland et Ewen, 1974	Lapin	<i>Aedes aegypti</i>	Homogénat d'adultes entiers de moustiques	Fécondité réduite de 31%, mortalité non affectée
Brossard, 1976	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Antigènes de glandes salivaires	Production d'anticorps, résistance à l'infestation
Schlein et Lewis, 1976	Lapin	<i>Stomoxys calcitrans</i> (A), <i>Glossina morsitans</i> (B)	(i)cuticule et cellules adhérentes de l'hypoderme, (ii)muscles thoraciques, (iii)tissus abdominaux, (iv) bourgeons ailiers de <i>S. calcitrans</i> .	(A)Mortalité augmentée, paralysies des membres ou des ailes, difficultés à se nourrir (B)Mortalité augmentée pour (i), (iv)
Allen et Humphreys, 1979	Cobaye	<i>Dermacentor andersoni</i>	Tube digestif et organes reproducteurs Tous les organes internes	Chute de ponte, pas d'éclosion de larves viables Gorgement et oviposition impossibles
Ackerman et al., 1980	Rat	<i>Dermacentor variabilis</i>	Extraits de tissus d'appareils digestifs	Attachement retardé, baisse du poids des tiques gorgées, baisse des performances de reproduction
Wikel, 1981	?	<i>Dermacentor andersoni</i>	Antigènes de glandes salivaires	Réduction significative du poids des tiques après gorgement, réduction du nombre de larves
McGowan et al., 1981	Bovin	<i>Amblyomma americanum</i>	Homogénat d'adultes entiers de tiques	Baisse du poids des femelles gorgées
Kaaya et Alemu, 1982	Lapin	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Extraits bruts de mouches	Baisse de fécondité et augmentation de la mortalité des pupes
Kaaya et Alemu, 1984	Lapin	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Trypsine de tsé-tsé	Augmentation significative de la mortalité, diminution du poids des pupes
Otieno, Vundla et Mongi, 1984	Lapin	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Extraits bruts de protéases du tube digestif	Activité trypsine/protéase VI diminuée. Problèmes de digestion du repas de sang chez certaines mouches. Pas d'augmentation de la mortalité.
Mongi et al., 1986	Lapin	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Antigènes de femelles entières	Durée du repas de sang augmentée, mais poids final non modifié
Johnston et al., 1986	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Extraits de femelles adultes	Charge parasitaire réduite de 70%
Desquesnes et Vion, 1987	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Antigènes intestinaux	Augmentation de la mortalité, gorgement incomplet, rupture du tube digestif
Pruett et al., 1987	Bovin	<i>Hypoderma spp</i>	Hypodermine A	Augmentation de la mortalité
Munn et al., 1987	Ovin	<i>Haemonchus contortus</i>	Contortine	réduction de 78% de la charge parasitaire et de la production d'œufs
Wikel, 1988	Cobaye	<i>Amblyomma americanum</i> .	Fragments de la bordure en brosse des intestins	Poids des femelles gorgées réduit jusqu'à 69,8%,

				mortalité des tiques de 37,5 à 71,5%.
Opdebeeck et al., 1988	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Immunogènes du tractus digestif ou combinaison d'antigènes du tube digestif et du ganglion nerveux céphalique	Réduction de l'infestation de 87 et 80%, production d'œufs diminuée de 95 et 91% respectivement
Ramasamy et al., 1988	Lapin	<i>Aedes aegypti n</i>	(i) tête et thorax ; (ii) intestins ; (iii), reste de l'abdomen.	Fécondité réduite, pas de modification de la mortalité
Willadsen et al., 1989	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Bm86	Réduction de la charge parasitaire, réduction considérable des performances de reproduction
Banerjee et al., 1990	Bovin	<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>	Antigènes de glandes salivaires	Augmentation significative du temps de gorgement et diminution du poids des tiques gorgées, diminution des performances de reproduction
Wong et Opdebeeck, 1990	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Extraits de membrane larvaire	Production d'œufs réduite de 78%
Desquesnes, 1990	Lapin	<i>Glossina fuscipes fuscipes</i>	Intestins ou jabots homogénéisés	Augmentation statistiquement significative de la mortalité hebdomadaire
Ratzlaff et Wikel, 1990	Souris	<i>Polyplax serrata</i>	Immunogènes de poux	charge parasitaire/ poids de l'hôte réduit de 62%
Essuman et al., 1991	Bovin	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Immunogènes solubles et partiellement purifiés de la membrane du tube digestif de femelles	Poids des tiques gorgées réduit, viabilité des œufs diminuée
Tembo et Rechav, 1992	Lapin	<i>Amblyomma. hebraeum et A. marmoreum</i>	Homogénats de nymphes	Résistance à l'infestation
Tellam et al., 1992	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Bm 86	Réduction de la population parasitaire de 90% sur une génération
Ramasamy et al., 1992	Lapin	<i>Anopheles tessellatus, Cx.quinquefasciatus</i>	(i) tête et thorax ; (ii) intestins ; (iii), reste de l'abdomen d' <i>Anopheles tessellatus</i>	Augmentation de la mortalité de <i>Cx.quinquefasciatus</i> , pour les fractions(i) et (ii). Production d'œufs de <i>A.tessellatus</i> réduite. Baisses de fécondité de 15% pour(i), 20%pour (ii) et 23% pour (iii)
East et al., 1993	Ovin	<i>Lucilia cuprina</i>	Péritrophines 95, 48, 44 et 30	Inhibition de la croissance larvaire <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> mais pas d'augmentation de la mortalité des larves <i>in vivo</i> .
Opdebeeck et Slacek, 1993	Chat	<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Intestins de puces	Aucune différence de charge parasitaire ou de fécondité, malgré titres en Ac élevés
Munn et al., 1993	Ovin	<i>Haemonchus contortus</i>	H11	Réduction du poids de la charge parasitaire de 72 à 89%, production d'œufs réduite de 92%.
Opdebeeck, 1994	Bovin	<i>Boophilus microplus</i>	Immunogènes du tractus digestif	Réduction de la charge parasitaire de 82% à 91%
Smith et al.,	Ovin	<i>Haemonchus contortus</i>	H-gal-GP	Réduction de la charge

1994				parasitaire de 72% et du nombre moyen d'œufs par gramme de fécès de plus de 93%
Desquesnes, 1997	Bovin	<i>Tabanus importunus</i>	Broyat d'intestins moyens de taons à jeun	Augmentation de la durée moyenne de survie
Lal et al., 2001	?	<i>Aedes gambiae</i>	Lysats intestinaux	Réduction de la fécondité et de la durée moyenne de survie
Tellam et al., 2003	Ovin	<i>Lucilia cuprina</i>	Péritrophine 55	Inhibition de la croissance larvaire de 51 à 66%

# **PARTIE EXPERIMENTALE**





# 1. MATERIELS ET METHODES

## 1.1. MOUCHES

L'élevage de *Glossina palpalis gambiensis* est réalisé au sein du CIRDES, en insectarium climatisé à 26°C et 70 à 80% d'humidité relative. Les détails de l'élevage des glossines ont été décrits par Itard et Bauer (1985).

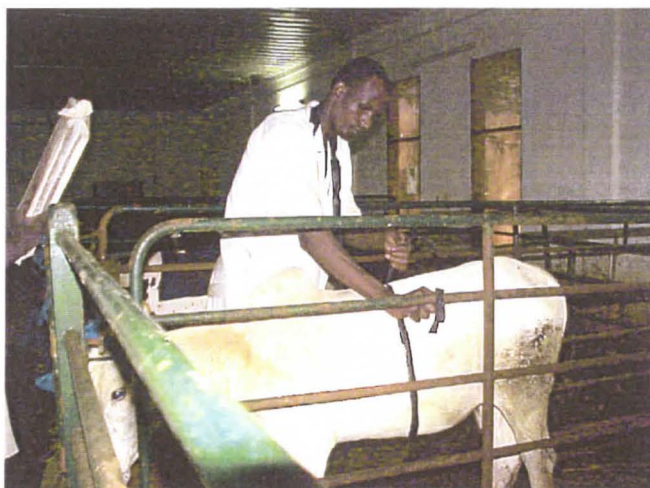
Dès l'éclosion, des lots de 110 femelles sont répartis dans des cages en moustiquaire de 20x40x5cm. Après leur premier repas, ces femelles sont triées : les morts et les individus non gorgés sont éliminés, et le nombre de femelles par cage est ramené à 100.

Des mâles, environ 70 par lot de femelles, sont introduits dans les cages au 5<sup>ème</sup> jour, pour réaliser l'accouplement.



Figure 2 : cages contenant les lots de mouches. Les cages sont identifiées avec le numéro du bovin sur lequel les mouches sont nourries, le nom de la fraction avec laquelle le bovin a été vacciné et le numéro du challenge.

Tous les 1 à 2 jours, les cages sont fixées sur les flancs des bovins de l'expérience. Ce dispositif permet aux mouches d'effectuer leur repas de sang, pendant 10 à 20 minutes.





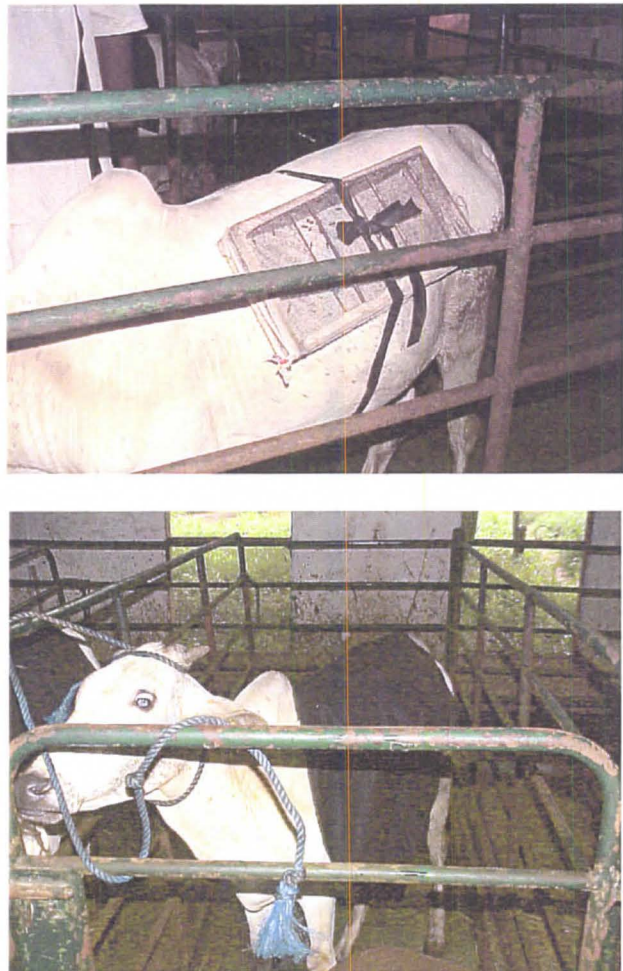


Figure 3 : repas de sang des mouches. Les cages sont fixées sur les bovins à l'aide d'une sangle, et sont ensuite recouvertes d'un tissu noir pendant toute la durée du gorgement.

Entre les repas, les cages sont maintenues dans les conditions optimales précédemment décrites, sur des pondoïrs. Ce système permet de récupérer la production de pupes de chaque lot de mouches.

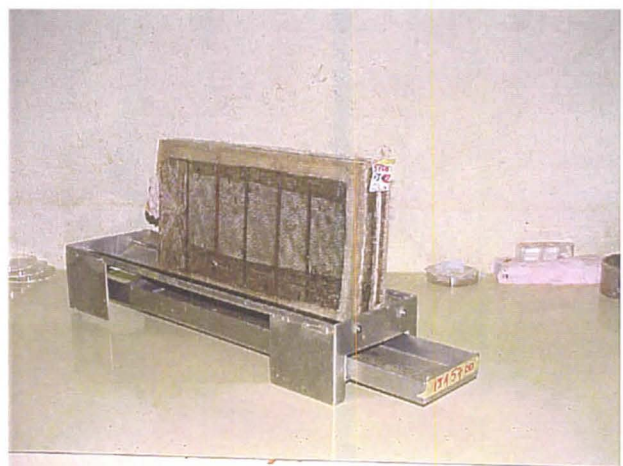


Figure 4 : cage sur son pondoïr. Les pupes sont récupérées grâce à un système de tiroir.

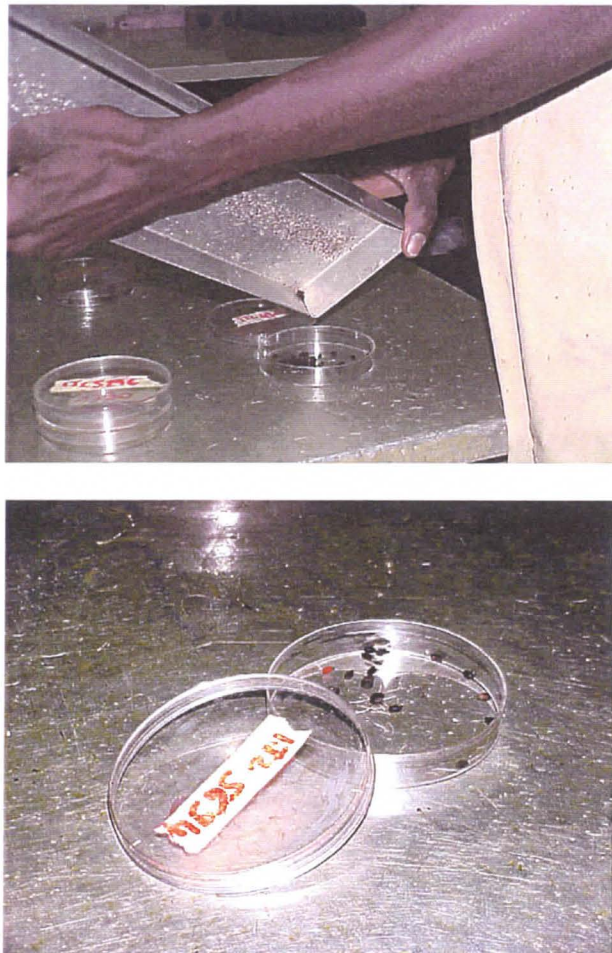


Figure 5 : collecte quotidienne des pupes. Les pupes sont placées dans des boîtes de Petri identifiées à l'aide du numéro de lot des mouches.

La mortalité et les performances de reproduction sont enregistrées quotidiennement.

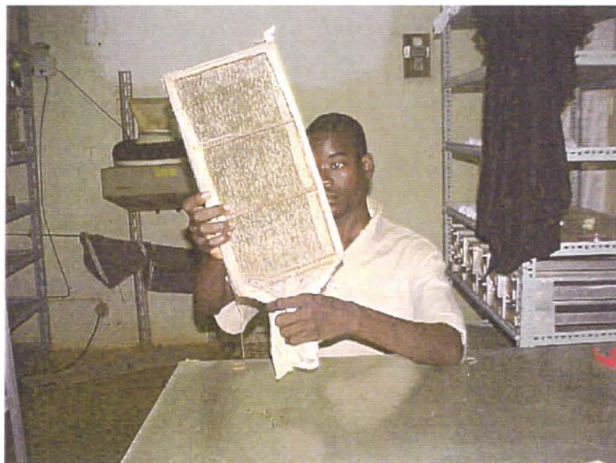


Figure 6 : comptage quotidien des mouches mortes.





Figure 7 : pesée des pupes

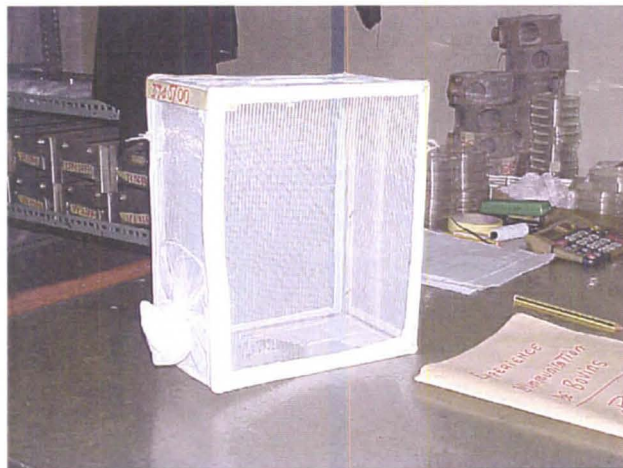


Figure 8 : cage d'éclosion. Les boîtes de Petri contenant les pupes sont placées dans ces cages.

## 1.2. BOVINS

Des bovins de races croisées, âgés d'environ 1 an et demi à 2 ans, ont été utilisés pour cette expérience d'immunisation. Ces animaux sont élevés sous moustiquaires, au sein du CIRDES.

Les 19 bovins choisis ont été traités aux trypanocides avant le début de l'expérience. Des contrôles sérologiques et un suivi sanitaire ont été effectués, et les animaux n'ont subi aucun traitement chimique pendant toute la durée de l'expérimentation.

Le suivi de la mortalité et des performances de reproduction des glossines sur une génération a permis de sélectionner 14 bovins pour la phase de vaccination.

Ces bovins ont été divisés en 4 groupes (T, IJ, IP, JJP) de 2 à 4 animaux, en fonction de la fraction antigénique qui leur a été inoculée.

## 1.3. VACCINS

### 1.3.1. Dissection des glossines :

La préparation des antigènes est faite à partir de :

- 2000 intestins moyens de *Glossina palpalis gambiensis* ténérales, âgées de 2 jours et à jeun
- 1400 intestins moyens de *Glossina palpalis gambiensis* 3 jours après leur premier repas de sang
- 6000 jabots issus des deux lots précédents (3400) et 2600 jabots à jeun supplémentaires.

Après dissection, les organes sont récoltés dans du liquide physiologique, et, en fin de séance, transférés dans un nouveau milieu contenant un cocktail d'antienzymes, à raison de :

- 50 intestins à jeun par ml (au final 40ml à environ 13,5 mg/ml)
- 50 intestins post-prandiaux par ml (au final 28 ml à environ 19,3 mg/ml)
- 200 jabots par ml ( au final 30 ml à environ 9 mg/ml).

Ces trois fractions sont libellées IJ (intestins à jeun), IP (intestins post-prandiaux) et JJP (jabots à jeun et post-prandiaux), puis congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.3.2. Préparation des antigènes :

Les 3 fractions sont décongelées au bain-marie à  $25^{\circ}\text{C}$  et étendues aux volumes suivants :

- 40 ml d'IJ + 20 ml d'eau = 60 ml à environ 9 mg/ml
- 28 ml d'IP + 37 ml d'eau = 60 ml à environ 9 mg/ml
- 30 ml de JJP à environ 9 mg/ml (non étendu).

Chaque fraction est traitée de la manière suivante :

- Placée dans des seringues de 20ml pour broyage par 20 passages successifs entre deux seringues
- Placée dans des cryotubes pour subir 5 cycles de congélation-décongélation en azote liquide et bain-marie à  $25^{\circ}\text{C}$
- Exposée à sonification 6 fois 1 minute sur glace
- Placée dans un potter pour broyage minutieux des organes sur glace (prendre beaucoup de précautions pour ne pas briser le potter ou perdre l'antigène).

Un volume de 0,5 ml est prélevé de chaque fraction pour le dosage des protéines. Ce dosage est réalisé avant puis après centrifugation. Le pellet est séché et pesé. Après dosage, le volume prélevé est remplacé dans la fraction initiale dont le volume est vérifié avant d'étendre chaque fraction à la concentration sérique de 7 mg/ml pour les fractions IP et IJ, et à 3,5 mg/ml pour la fraction JJP.

Les fractions sont ensuite aliquotées en 12 aliquotes de 5 ml ( le reliquat en aliquotes de 2,5 ml) et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'inoculation aux bovins. En principe on doit disposer d'au moins 12 aliquotes d'IJ et d'IP pour immunisation de 4 bovins, et de 6 à 7 aliquotes de JJP pour immunisation de 2 bovins.



## 1.4. PROTOCOLE D'IMMUNISATION

### 1.4.1. Challenge 0 des mouches, J0-J30

Cette phase a pour but de sélectionner les 14 bovins à immuniser.

Les 19 bovins sont utilisés pour cette épreuve zéro. A chaque bovin correspond un lot de 100 femelles *Glossina palpalis gambiensis*, dont le numéro est celui du bovin. Après le deuxième repas de sang, 50 mâles sont introduits dans chaque lot de mouches pour accouplement.

Les lots de mouches sont nourris sur les bovins non immunisés tous les deux jours, pendant 30 jours.

Pour chaque lot de mouche sont enregistrés :

- Les mortalités journalières et cumulées sur 30 jours
- Le cumul des pontes, le taux de ponte et le poids des pupes.

Les bovins dont les résultats, en terme de performance des mouches, s'éloignent de la moyenne sont sortis du protocole.

### 1.4.2. Immunisation des bovins, J35-J65

Les lots de bovins sont constitués ainsi :

- 4 bovins sont immunisés avec la fraction IJ
- 4 bovins le sont avec la fraction IP
- 4 bovins reçoivent de l'eau physiologique additionnée d'adjuvant
- 2 bovins sont immunisés avec la fraction JJP.

Chaque animal reçoit trois injections :

- A J35, 5ml de fraction + 5 ml d'adjuvant complet de Freund en IM profonde
- A J55, 5 ml de fraction + 5 ml d'adjuvant incomplet de Freund en IM profonde
- A J65, 5ml de fraction + 5 ml d'adjuvant incomplet de Freund en IM profonde.

### 1.4.3. Challenges des mouches, J70-J125

#### 1.4.3.1 J70-J105

Le challenge 1 commence 5 jours après la dernière injection immunisante.

Les 14 lots de mouches sont dénommés comme suit : IJ1, IP1, JJP1, T1, suivi du numéro de boucle du bovin.

#### 1.4.3.2 J90-J125

Le challenge 2 commence 3 semaines après le début du premier challenge.

Les lots de mouches sont dénommés comme suit : IJ2, IP2, JJP2, T2, suivi du numéro de boucle du bovin.

Pendant 5 semaines, les lots de mouches sont nourris tous les 1 à 2 jours sur les bovins immunisés

Lors des deux challenges successifs, la mortalité et les performances de reproduction sont suivis pour chaque lot de mouche :

- Enregistrement quotidien de la mortalité et calcul du taux de mortalité à J35
- Enregistrement du nombre et du poids des pupes, calcul du taux de ponte.

## **1.5. REALISATION DE WESTERN BLOTS ET D'ELISA**

Une collecte de sérum est effectuée de manière hebdomadaire, à partir du début du protocole d'immunisation.

Ces sérums sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ils sont utilisés pour la réalisation de western blots ainsi que pour celle de sérologies.

### **1.5.1. Electrophorèse**

(cf. annexe 2)

Les protéines IJ, IP et JJP sont séparées par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide.

Les échantillons sont réduits avec une solution de bleu de Laemmli contenant du 2-bêta-mercaptoéthanol, et bouillis 3 minutes à  $100^{\circ}\text{C}$ . Ils sont déposés sur un gel de stacking à 4% et séparés sur un gel de séparation à 12,5%. Un marqueur de poids moléculaire est déposé sur le même gel.

### **1.5.2. Transfert sur membrane et révélation**

(cf. annexe 3)

Le transfert est effectué à partir du gel de polyacrylamide, sur une membrane PVDF.

Les sera bovins sont ensuite incubés de manière à ce que les anticorps se fixent aux antigènes présents sur la membrane. Après rinçage, un anticorps conjugué anti-bovin est ensuite fixé sur les anticorps sériques. Enfin, la révélation permet de faire apparaître les bandes correspondant aux complexes anticorps - antigènes.

### **1.5.3. Sérologies**

Des ELISA ont été réalisées à partir des sérums des bovins, à quinze jours d'intervalle. Les antigènes utilisés pour ces sérologies sont IJ, IP, JJP.

## **1.6. METHODES STATISTIQUES D'EXPLOITATION DES RESULTATS**

Pour analyser les observations faites au cours de cette expérience, les outils statistiques employés sont le test de l'écart réduit et la comparaison de moyennes.



### 1.6.1. Test de l'écart réduit

Il permet de comparer deux pourcentages, et est donc utilisé pour comparer les taux de mortalité.

Sa formule est :

$$\varepsilon = \frac{P_a - P_b}{\sqrt{\frac{P_a * Q_a}{n_a} + \frac{P_b * Q_b}{n_b}}}$$

Où  $P_A$  et  $P_B$  sont les pourcentages observés sur les échantillons  $n_A$  et  $n_B$ .

Si  $\varepsilon < 1,96$ , la différence n'est pas significative à 5%.

Si  $\varepsilon > 1,96$ , la différence est significative, et le risque correspondant à  $\varepsilon$ , lu dans la table de l'écart réduit, détermine le niveau de signification.

### 1.6.2. Test de Student

Dans le cas de petits effectifs inégaux, aux variances différentes, la comparaison entre deux moyennes  $m_1$  et  $m_2$  observées sur deux échantillons  $n_1$  et  $n_2$  se fait grâce à la formule suivante :

$$t'0 = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{s^2_1}{n_1} + \frac{s^2_2}{n_2}}}$$

Où  $S^2$  désigne la variance.

La valeur  $t'0$  doit être comparée à un  $T$  dont le nombre de degrés de liberté  $k'$  est l'entier le plus proche de :

$$k = \frac{\left[ \frac{s^2_1}{n_1} + \frac{s^2_2}{n_2} \right]^2}{\frac{1}{n_1 - 1} \left[ \frac{s^2_1}{n_1} \right]^2 + \frac{1}{n_2 - 1} \left[ \frac{s^2_2}{n_2} \right]^2}$$

Si  $t'0 < T_{k, 0,05}$ , la différence n'est pas significative au seuil de 5%.

Si  $t'0 > T_{k, 0,05}$ , la différence est significative, et le risque  $t'0$  lu dans la table de Student détermine le niveau de signification.

Cette formule est utilisée pour comparer les moyennes des poids des pupes, les moyennes des taux et des cumuls de pontes.

## 2. RESULTATS

### 2.1. CHALLENGE 0

#### 2.1.1. Performances des 19 lots de mouches

Comme nous l'avons vu précédemment, le challenge 0 a pour but de sélectionner 14 bovins pour les essais d'immunisation, à partir des performances des lots de mouches nourris sur ces animaux.

Les résultats enregistrés au cours de ce suivi sont regroupés dans le tableau suivant :

Numéro du lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J30	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Poids moyen des pupes
1378	15	193	24,2
1387	29	158	24,7
5697	35	140	23,3
1394	13	170	25,5
5498	26	164	23,5
5684	37	144	23,5
4861	22	172	23,6
5296	21	159	23
5679	31	143	23,3
5700	30	130	22,6
5694	29	158	23,6
4908	36	172	25,2
5689	34	97	22,9
4867	33	141	23,4
5699	26	176	24,5
5677	29	144	23,8
1390	28	155	23,9
5688	19	116	23,6
1380	18	178	24,6
MOYENNE	26,9	153,2	23,8

Figure 9 : résultats du challenge 0

Les représentations graphiques des courbes de survie des mouches et des cumuls de ponte permettent de mieux visualiser la répartition des performances des différents lots de mouches :

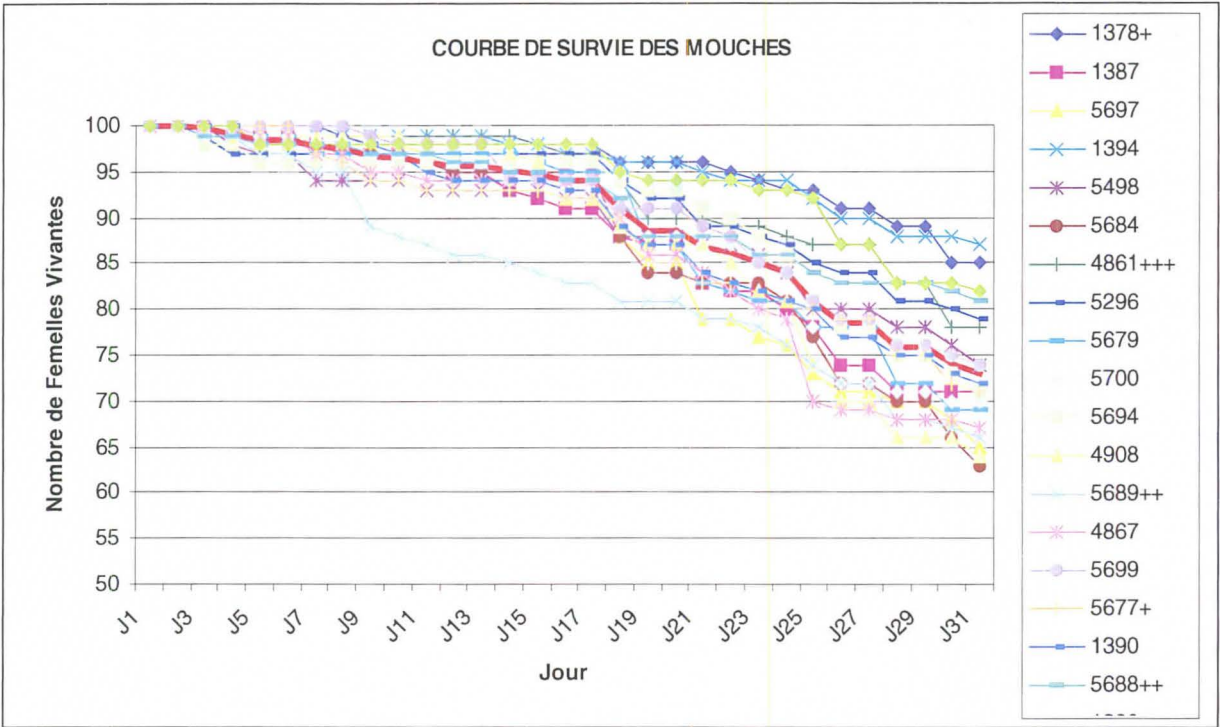


Figure 10 : courbes de survie des mouches lors du challenge 0

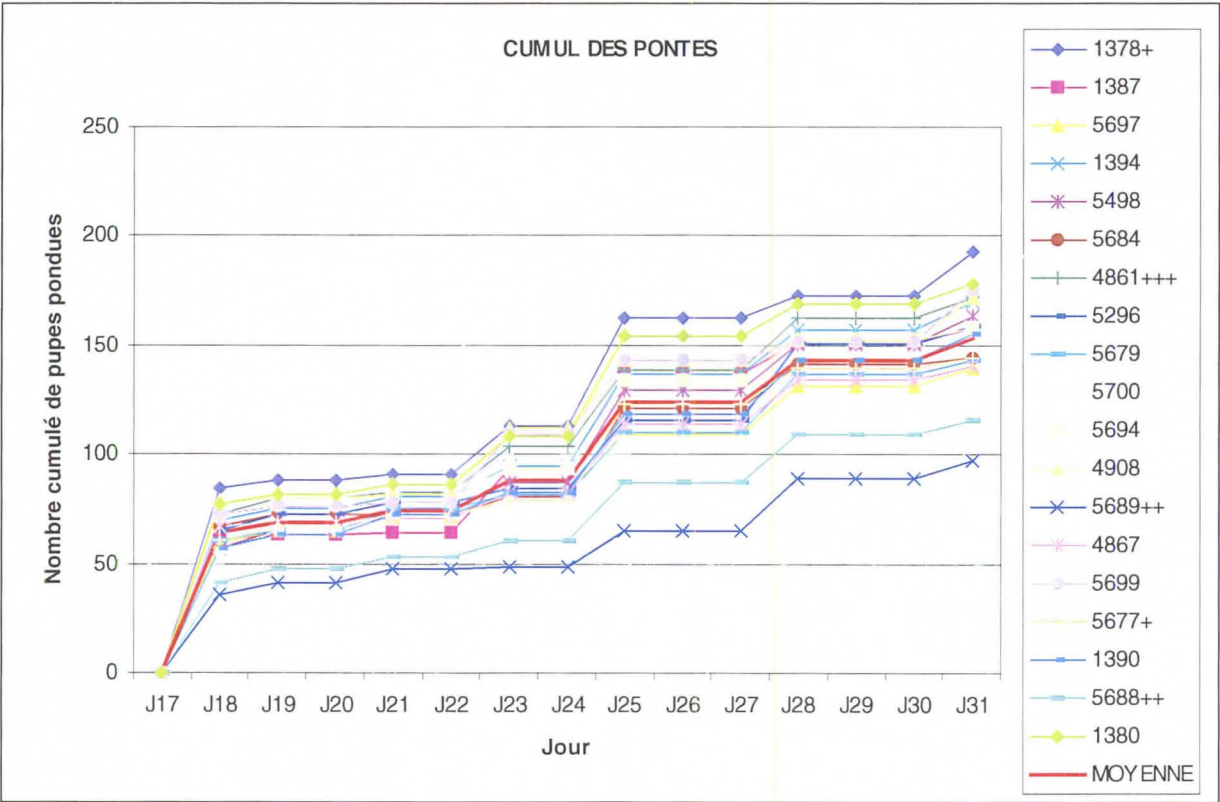


Figure 11 : cumuls de ponte du challenge 0



### **2.1.2. Elimination de 5 bovins en fonction des performances des lots de mouches**

Les résultats présentés ci-dessus nous ont permis d'écarter 5 bovins, pour lesquels les performances des lots de mouches étaient éloignées de la moyenne.

Pour chacun de ces animaux, nous allons brièvement évoquer les raisons de son éviction.

#### **2.1.2.1 Bovin n° 5689**

Le lot de mouches nourries sur cet animal présente une courbe de mortalité dont le profil diffère des autres lots. De plus, l'effectif de mouches vivantes après 30 jours est plus faible que la moyenne.

Les performances de reproductions sont également faibles : nombre total de pupes pondues inférieur à celui des autres groupes et pupes de faible poids.

#### **2.1.2.2 Bovin n° 5688**

Le nombre total de pupes pondues par ce lot de mouches est nettement inférieur à la moyenne de l'ensemble des lots.

De plus, la mortalité du lot de mouche nourri sur ce bovin est assez importante.

#### **2.1.2.3 Bovin n° 5697**

La mortalité observée sur le lot de mouches nourri sur le bovin n° 5697 est supérieure à la moyenne de l'ensemble des lots.

#### **2.1.2.4 Bovin n° 1378**

L'effectif de mouches vivantes après 30 jours de suivi est largement supérieur à la moyenne, pour les mouches nourries sur ce bovin.

De plus, le nombre total de pupes pondues par ce lot est bien plus grand que la moyenne.

#### **2.1.2.5 Bovin n° 1394**

La mortalité du lot de mouches nourries sur le bovin n°1394 est inférieure à la moyenne des 19 lots.

Le poids des pupes pondues par ce même lot de mouches est beaucoup plus grand que le poids moyen des pupes de la totalité des lots.

### **2.1.3. Constitution des quatre groupes JJP, IJ, IP et T**

Les animaux gardés pour l'essai d'immunisation ont été répartis de manière aléatoire en quatre groupes.

Des tests statistiques ont permis de vérifier que les lots ainsi constitués sont homogènes et qu'il n'existe pas de différence significative entre chacun des groupes vaccinés avec les fractions JJP, IJ et IP d'une part et le groupe témoin d'autre part.

2.1.3.1 Groupe Témoin :

Bovins n° 1380, 5684, 5679, 5498

2.1.3.2 Groupe JJP :

Bovins n° 5699 et 5677

2.1.3.3 Groupe II :

Bovins n° 5296, 5700, 5694 et 4908

2.1.3.4 Groupe IP :

Bovins n° 4861, 1390, 1387 et 4867

2.1.4. Résultats des différents groupes du challenge 0

(cf. annexe 4)

2.1.4.1 Suivi du groupe T0

Lot de mouches	Taux de mortalité (%)	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
T0 5679	31	143	160	23,3
T0 5498	26	164	183,5	23,5
T0 5684	37	144	163,6	23,5
T0 1380	18	178	188,5	24,6
Moyenne du groupe T	28	157,3	174,1	23,8

Figure 12 : résultats du groupe témoin pour le challenge 0

2.1.4.2 Suivi du groupe JJP0

Lot de mouches	Taux de mortalité (%)	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
JJP0 5699	26	176	193,1	24,5
JJP0 5677	29	144	162,3	23,8
Moyenne du groupe JJP	27,5	160	177,9	24,1

Figure 13 : résultats du groupe JJP pour le challenge 0

2.1.4.3 Suivi du groupe IJ0

Lot de mouches	Taux de mortalité (%)	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
IJ0 5694	29	158	174,3	23,6
IJ0 5700	30	130	145,6	22,6
IJ0 4908	36	172	194,7	25,2
IJ0 5296	21	159	172,2	23
Moyenne du groupe IJ	29	154,8	171,7	23,6

Figure 14 : résultats du groupe IJ pour le challenge 0

2.1.4.4 Suivi du groupe IP0

Lot de mouches	Taux de mortalité (%)	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
IP0 1390	28	155	173,7	23,9
IP0 4861	22	172	183,9	23,6
IP0 1387	29	158	178,9	24,7
IP0 4867	33	141	161,5	23,4
Moyenne du groupe IP	28	156,5	174,7	23,9

2.1.4.5  
2.1.4.6

Figure 15 : résultats du groupe IP pour le challenge 0

2.1.4.5 Comparaison des moyennes des groupes du challenge 0

Lot de mouches	Taux de mortalité (%)	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
Moyenne JJP0	27,5	160	177,9	24,1
Moyenne IJ0	29	154,8	171,7	23,6
Moyenne IP0	28	156,5	174,7	23,9
Moyenne T0	28	157,3	174,1	23,8

Figure 16 : moyennes des différents groupes du challenge 0



### 2.1.5. Taux de mortalité

Les courbes de survie des différents groupes sont les suivantes :

#### 2.1.5.1 Groupe T0

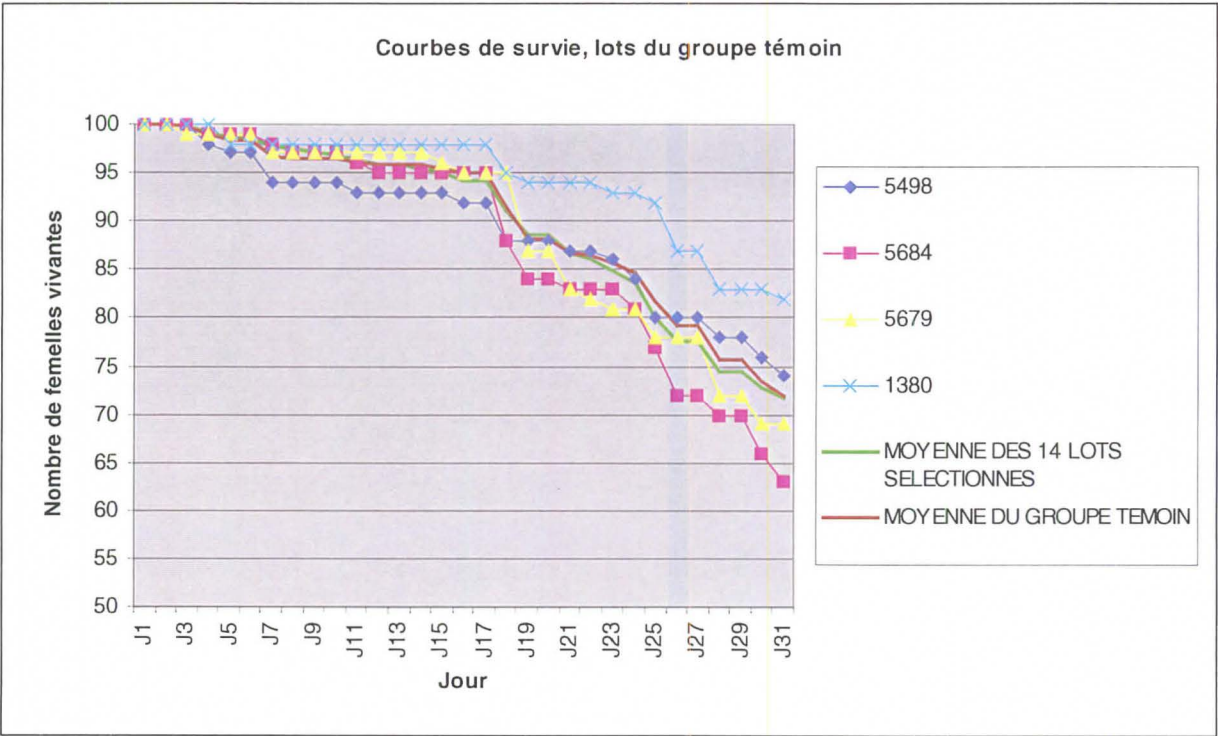


Figure 17 : courbes de survie du groupe témoin lors du challenge 0

#### 2.1.5.2 Groupe JJPO

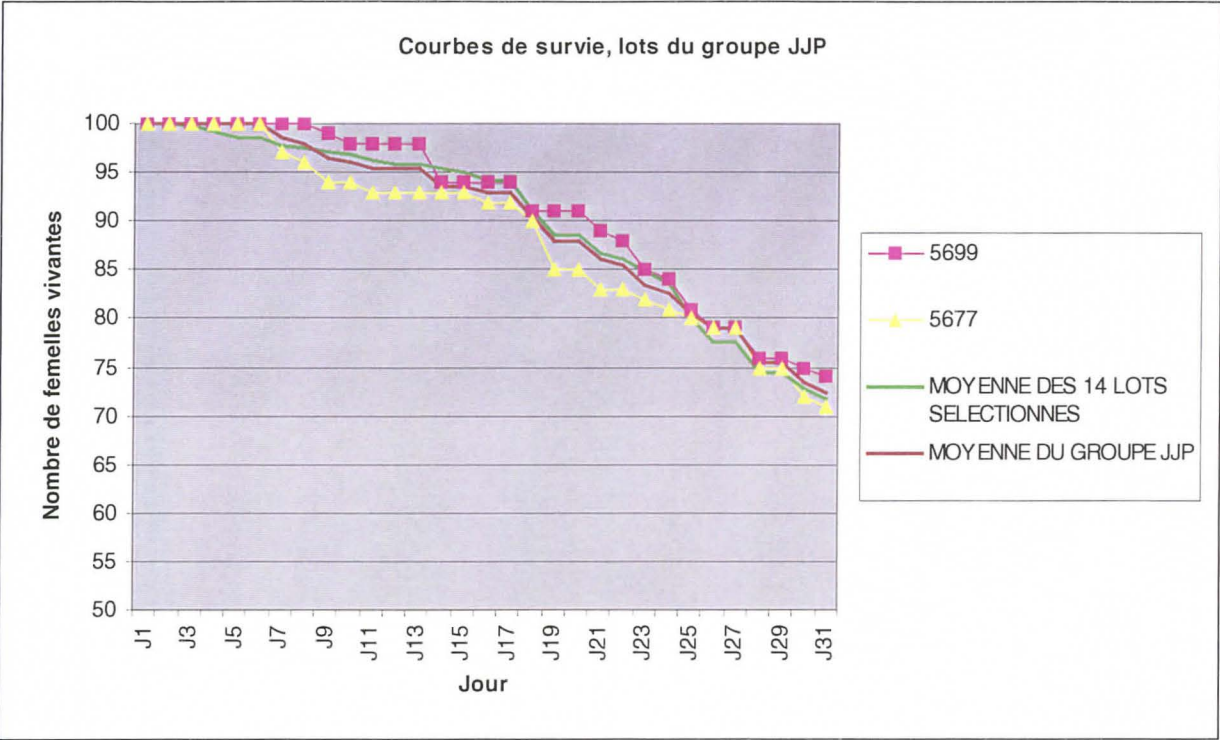


Figure 18 : courbes de survie du groupe JJP lors du challenge 0

2.1.5.3 Groupe IJ0

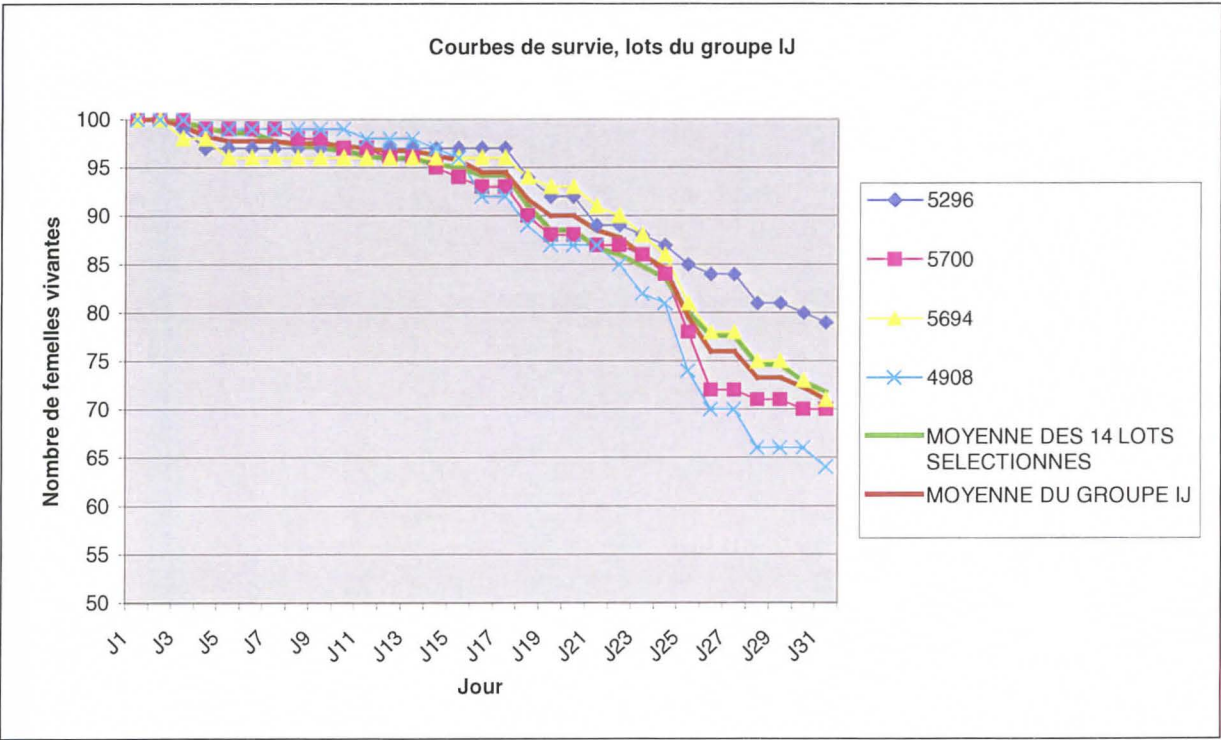


Figure 19 : courbes de survie du groupe IJ lors du challenge 0

2.1.5.4 Groupe IP0

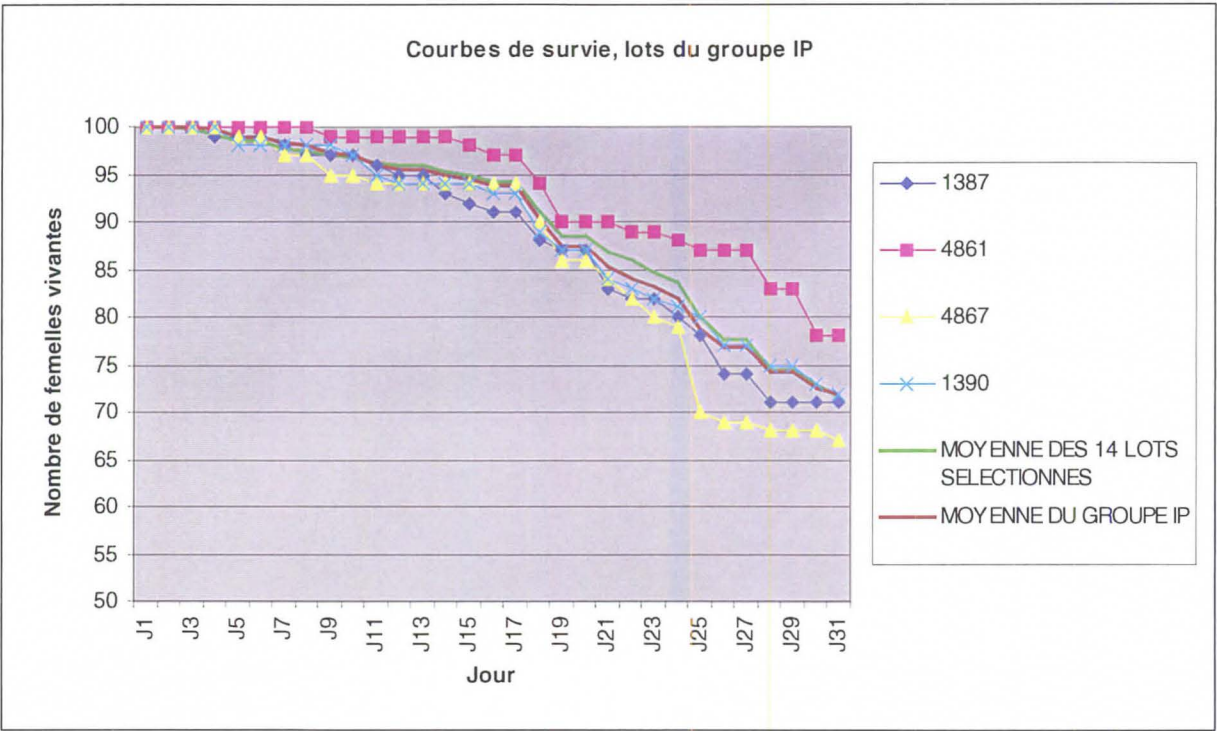


Figure 20 : courbes de survie du groupe IP lors du challenge 0

#### 2.1.5.5 Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 0

Les taux de mortalité des lots de mouches appartenant aux groupes JJP0, IJ0 et IP0 ont été comparés à celui des lots nourris sur les animaux témoins.

Le test utilisé pour faire cette comparaison de pourcentages est le Test de l'écart réduit.

L'analyse statistique des résultats a révélé qu'il n'existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les taux de mortalité des différents groupes.

#### 2.1.6. Cumul de ponte

Le cumul de ponte correspond au nombre total de pupes pondues par lot de 100 femelles gorgées à J0.

Les moyennes des taux de pontes des lots des groupes JJP0, IJ0 et IP0 ont été comparées à celle des lots du groupe T0, à l'aide de la formule détaillée dans la partie Matériels et Méthodes de ce rapport.

Après analyse statistique, il s'avère que les différences observées ne sont pas significatives à 5%.

#### 2.1.7. Taux de ponte

Le taux de ponte correspond au rapport suivant :



$$\frac{\text{Cumul de ponte}}{\text{Nombre de femelles en ponte/jour}} \times 100$$

Les taux de ponte des groupes JJP0, IJ0 et IP0 ont été comparés au taux de ponte du groupe témoin.

Les différences constatées entre les différents groupes ne sont statistiquement pas significatives.

**2.1.8. Poids des pupes**

Les moyennes des poids des pupes des lots des groupes JJP0, IJ0 et IP0 ont été comparées à celle des lots du groupe T0 avec la même formule que celle utilisée pour comparer les moyennes des cumuls de ponte.

L’analyse statistique a révélé que la différence observée entre respectivement, les lots JJP0 et T0, les lots IJ0 et T0, et les lots IP0 et T0, n’est pas significative au seuil de 5%.

**2.2. CHALLENGE 1**

(cf. annexe 5)

**2.2.1. Résultats**

Le challenge 1 a commencé 5 jours après la dernière injection immunisante et a duré 5 semaines.

Les résultats enregistrés au cours de cette période sont présentés ci-dessous :

2.2.1.1 Suivi du groupe T1

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
T1 5679	24	187	203,2	23,8
T1 5498	27	208	223,2	25,3
T1 5684	17	215	226,6	25,4
T1 1380	22	234	250,2	25,6
Moyenne du	22,5	211	225,9	25

<b>groupe T</b>				
-----------------	--	--	--	--

Figure 21 : résultats du groupe témoin pour le challenge 1

2.2.1.2 Suivi du groupe JJP1

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
JJP1 5699	44	157	179,6	23,4
JJP1 5677	17	226	238,2	25
Moyenne du groupe JJP	30,5	191,5	210,1	24,2

Figure 22 : résultats du groupe JJP pour le challenge 1

2.2.1.3 Suivi du groupe IJ1

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
IJ1 5694	25	117	128	23,8
IJ1 5700	39	152	182,3	23,5
IJ1 4908	13	232	239,5	25,5
IJ1 5296	17	209	220,3	23,9
Moyenne du groupe IJ	23,5	177,5	193,7	24,2

Figure 23 : résultats du groupe IJ pour le challenge 1

2.2.1.4 Suivi du groupe IP1

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
IP1 1390	14	230	240,7	25,2

<b>IP1 4861</b>	23	153	161,4	23,2
<b>IP1 1387</b>	20	218	230,4	24,7
<b>IP1 4867</b>	34	168	191,7	24,9
<b>Moyenne du groupe IP</b>	22,8	192,3	206,4	24,5

Figure 24 : résultats du groupe IP pour le challenge 1

2.2.1.5 Comparaison des moyennes des groupes du challenge 1

<b>Lot de mouches</b>	<b>Taux de mortalité (%) à J35</b>	<b>Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ</b>	<b>Taux de ponte (%)</b>	<b>Poids moyen des pupes</b>
<b>Moyenne JJP1</b>	30,5	191,5	210,1	24,2
<b>Moyenne IJ1</b>	23,5	177,5	193,7	24,2
<b>Moyenne IP1</b>	22,8	192,3	206,4	24,5
<b>Moyenne T1</b>	22,5	211	225,9	25

Figure 25 : moyennes des différents groupes du challenge 1

2.2.2. Taux de mortalité

Les courbes de survie des différents groupes sont les suivantes :

2.2.2.1 Groupe T1



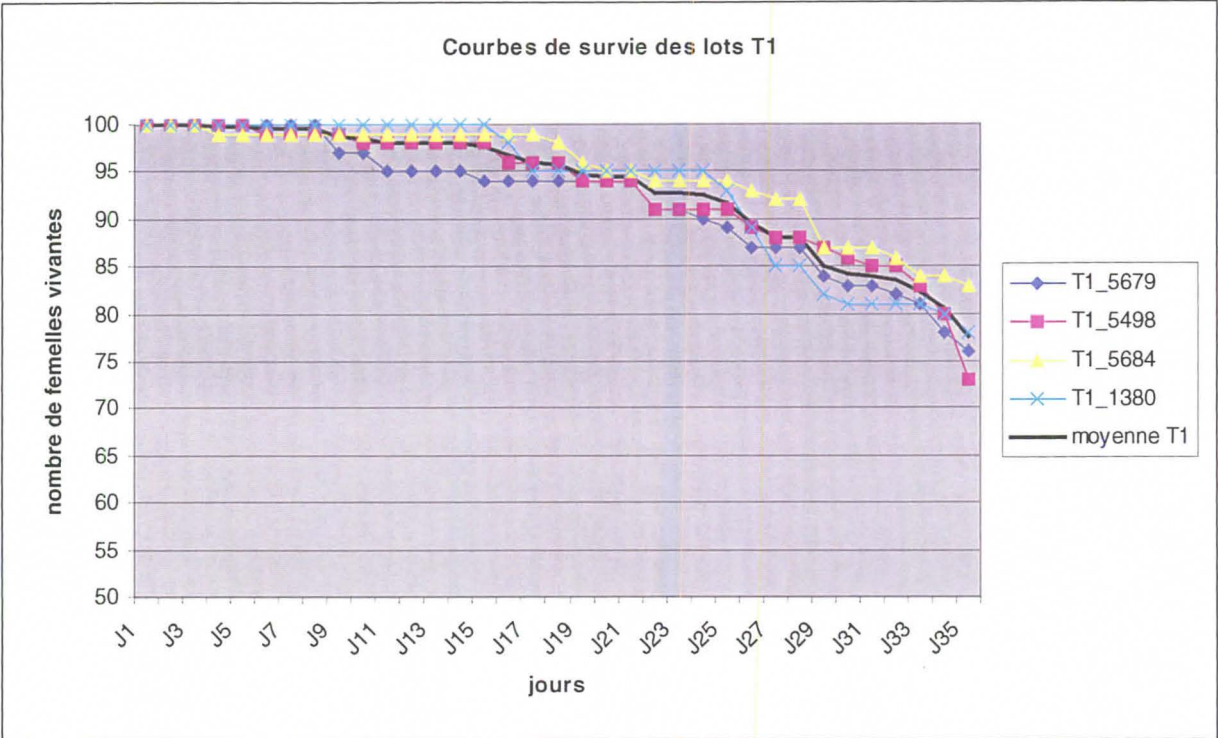


Figure 26 : courbes de survie du lot témoin pour le challenge 1

Le groupe T1 est assez homogène.

2.2.2.2 Groupe JJP1

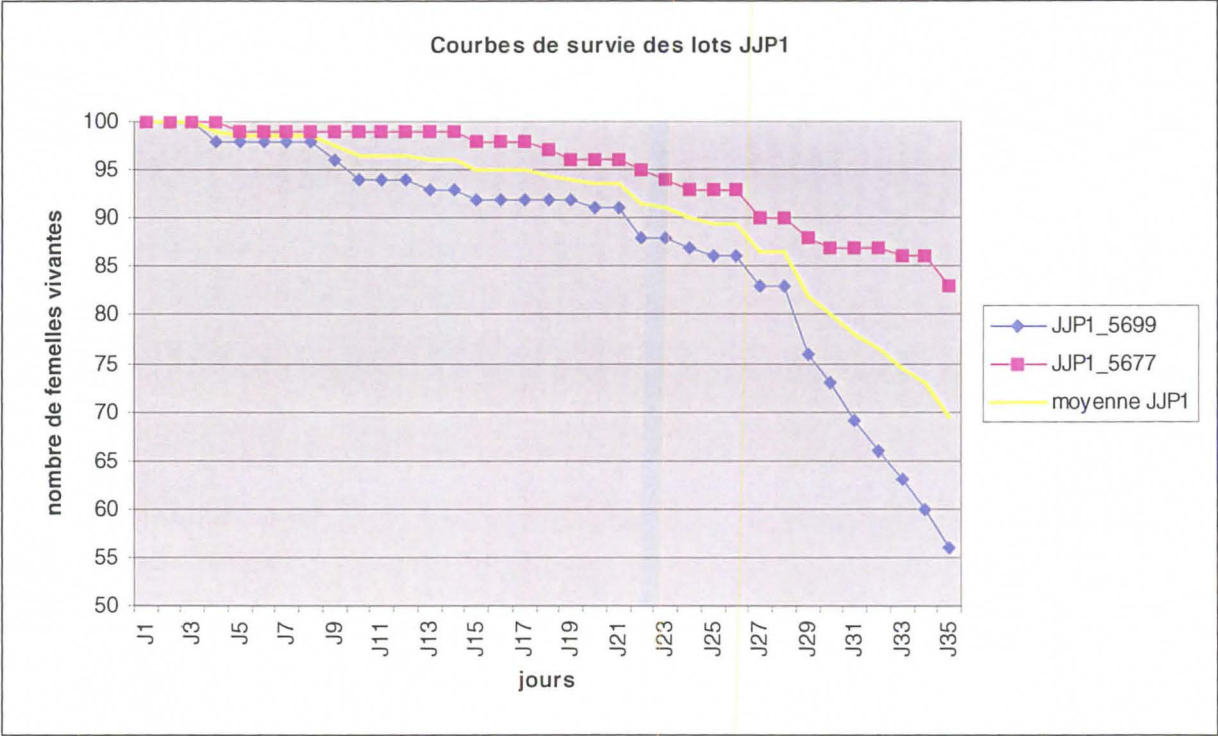


Figure 27 : courbes de survie du lot JJP pour le challenge 1

Les courbes de survie des deux lots du groupe JJP1 sont très différentes : la mortalité a été beaucoup plus importante dans le lot JJP1\_5699 que dans le lot JJP1\_5677.

2.2.2.3 Groupe IJ1

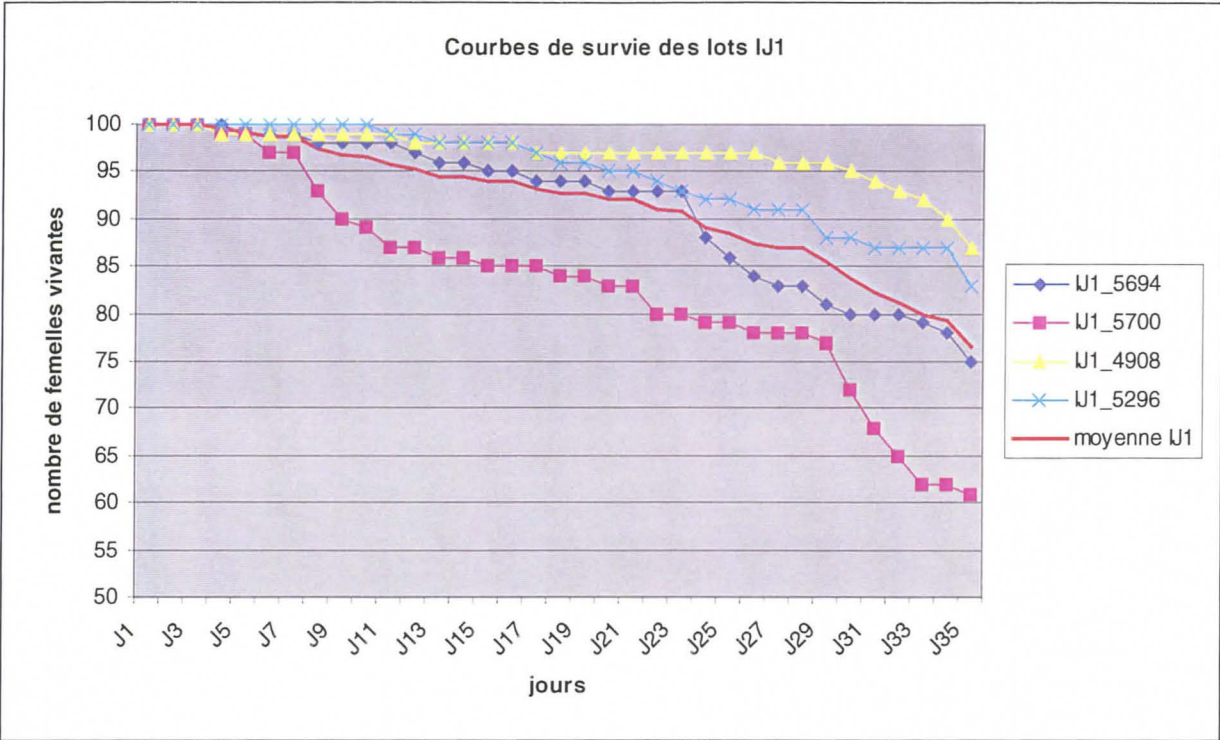


Figure 28 : courbes de survie du lot IJ pour le challenge 1

La variabilité intragroupe est également importante entre les lots du groupe IJ1. Le lot IJ1\_5700 notamment présente une forte mortalité.

2.2.2.4 Groupe IP1

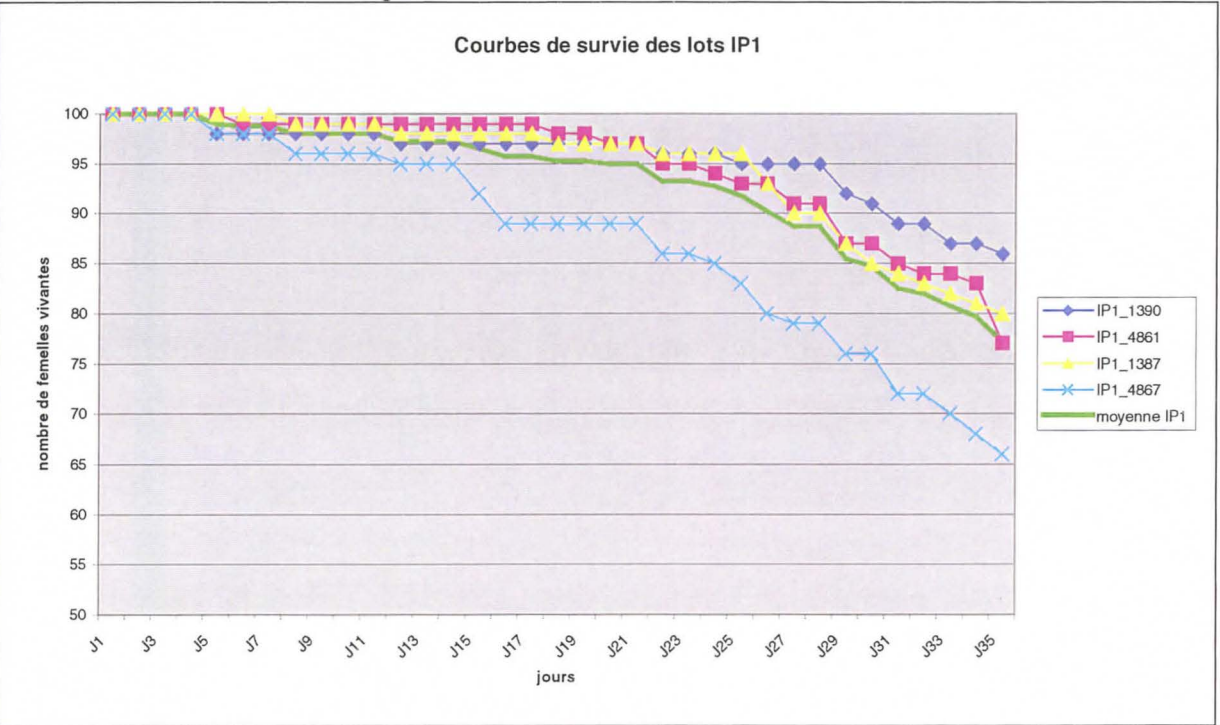


Figure 29 : courbes de survie du lot IP pour le challenge 1

Au sein du groupe IP1, la mortalité du lot IP1\_4867 apparaît plus importante que la mortalité des trois autres lots.

2.2.2.5 Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 1

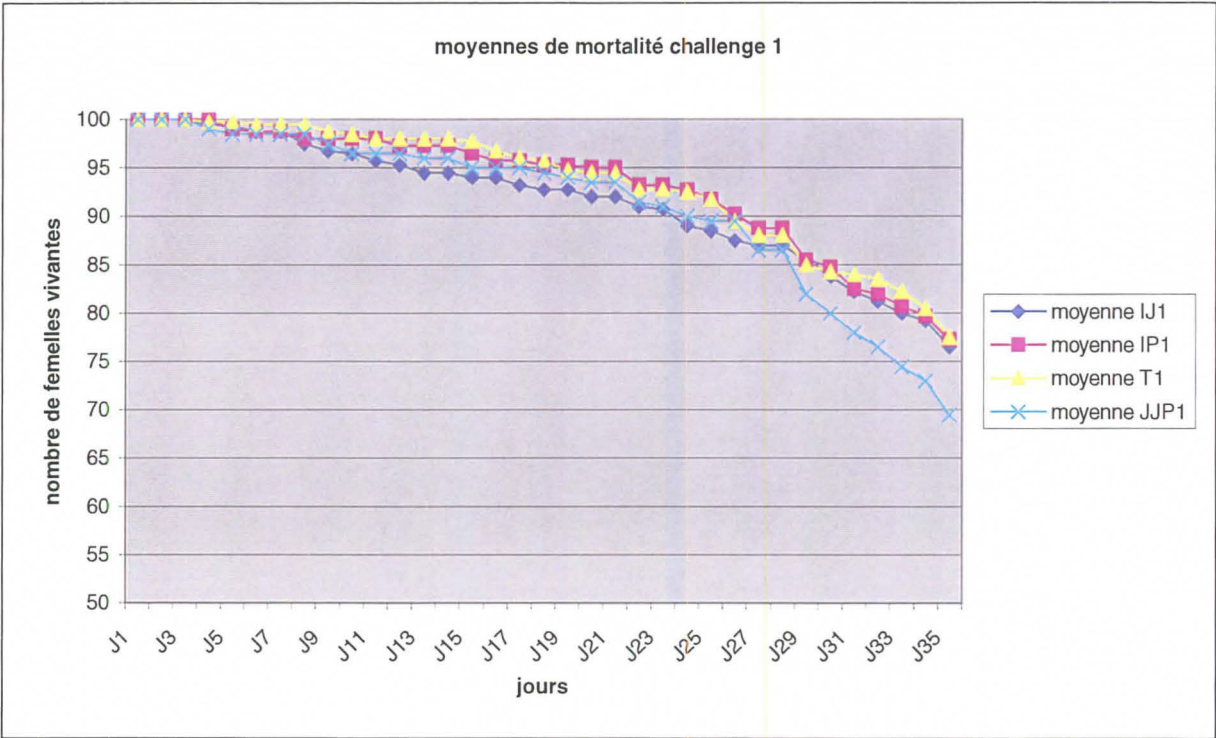


Figure 30 : courbes des moyennes de survie des différents groupes du challenge 1

Les taux de mortalités des lots de mouches nourries sur les bovins des différents groupes immunisés ont été comparés à celui des lots nourris sur les animaux témoins.

Le test utilisé pour faire cette comparaison de pourcentages est le Test de l'écart réduit.

L'analyse statistique des résultats a révélé que :

- La différence entre le taux de mortalité moyen des lots JJP1 et celui des lots T1 n'est pas significative au seuil de 5%
- La différence entre le taux de mortalité moyen des lots IJ1 et celui des lots T1 n'est pas significative au seuil de 5%
- La différence entre le taux de mortalité moyen des lots IP1 et celui des lots T1 n'est pas significative au seuil de 5%

2.2.3. Cumul de ponte

Les représentations graphiques des cumuls de pontes sont les suivantes :



2.2.3.1 Groupe T1

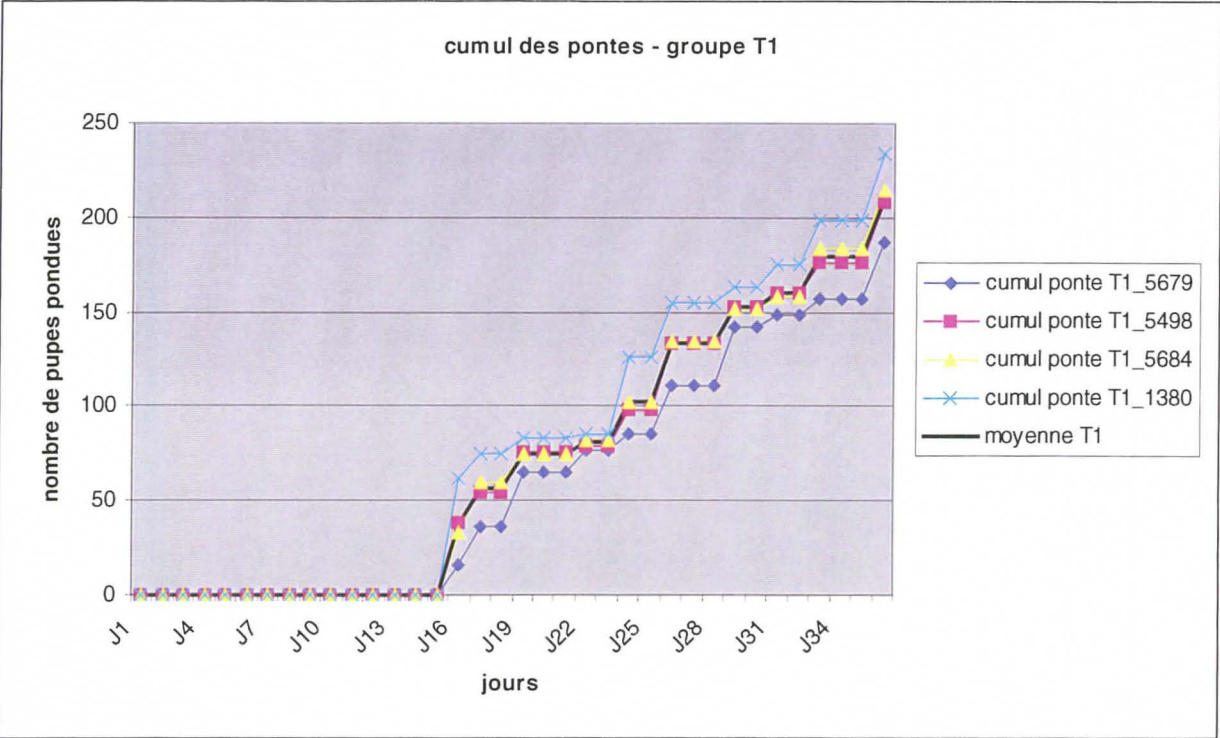


Figure 31 : cumul de ponte du groupe témoin, lors du challenge 1

2.2.3.2 Groupe JJP1

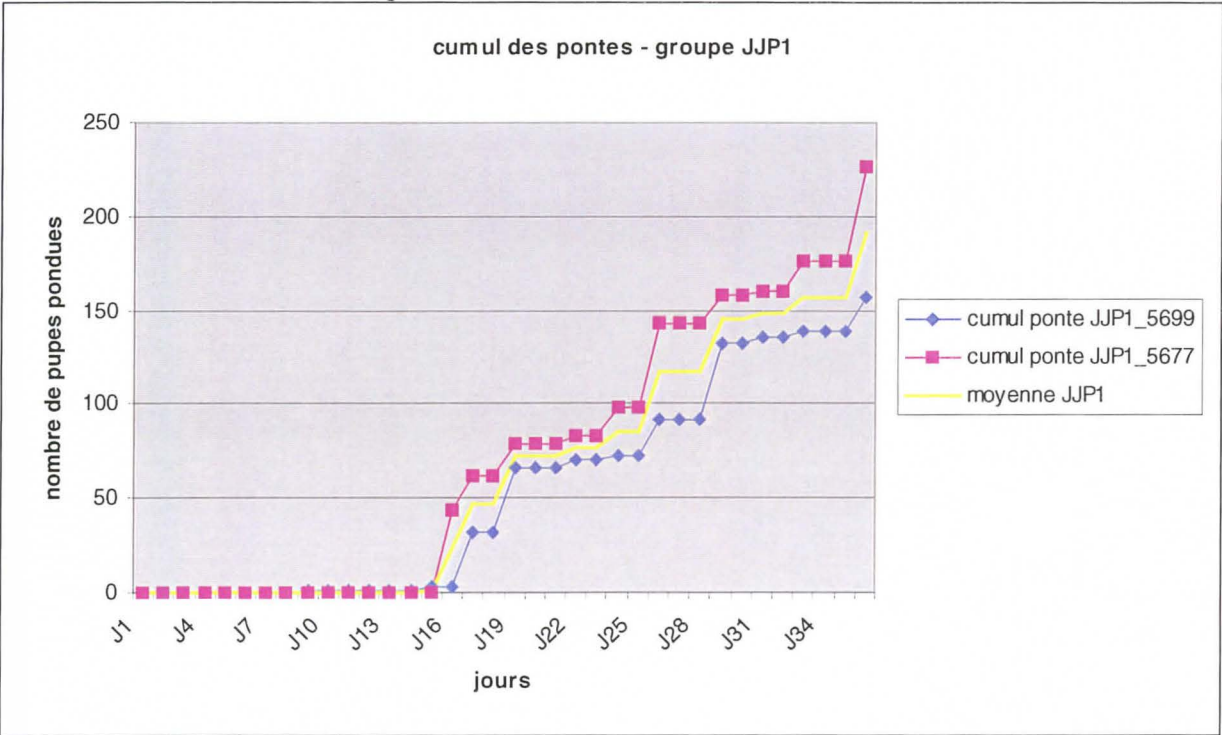


Figure 32 : cumul de ponte du groupe JJP, lors du challenge 1

2.2.3.3 Groupe IJ1

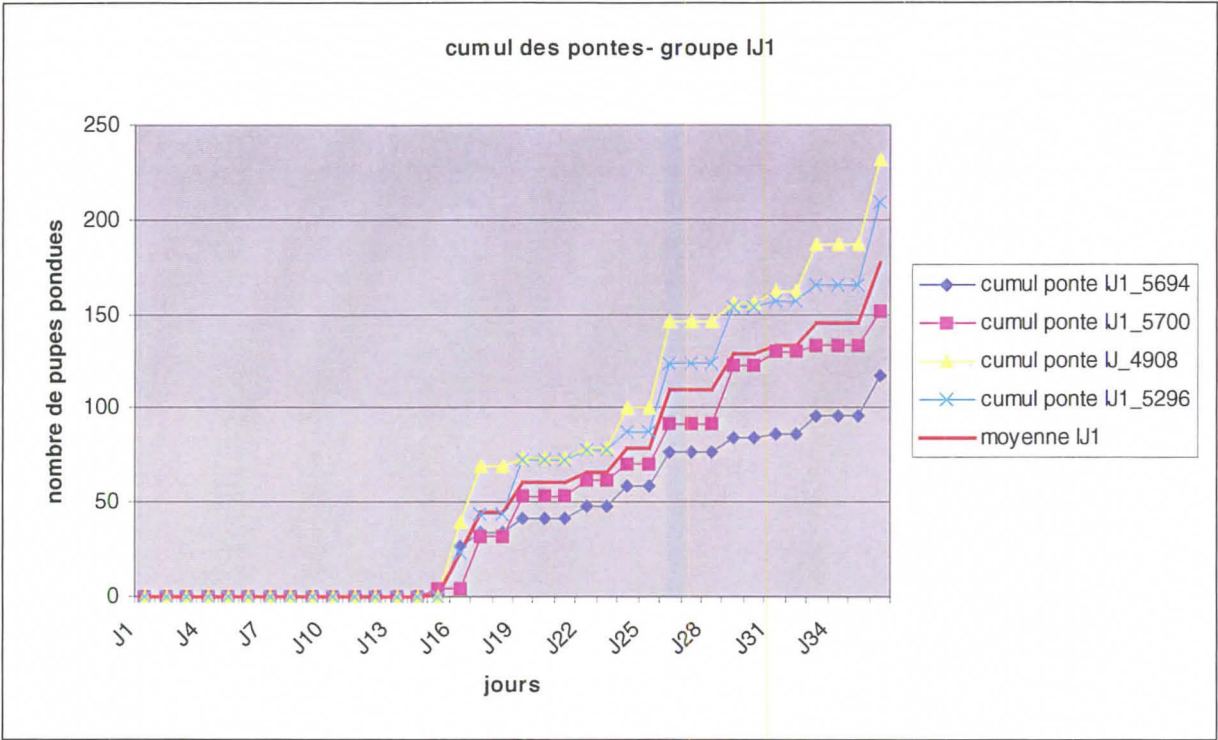


Figure 33 : cumul de ponte du groupe IJ, lors du challenge 1

2.2.3.4 Groupe IP1

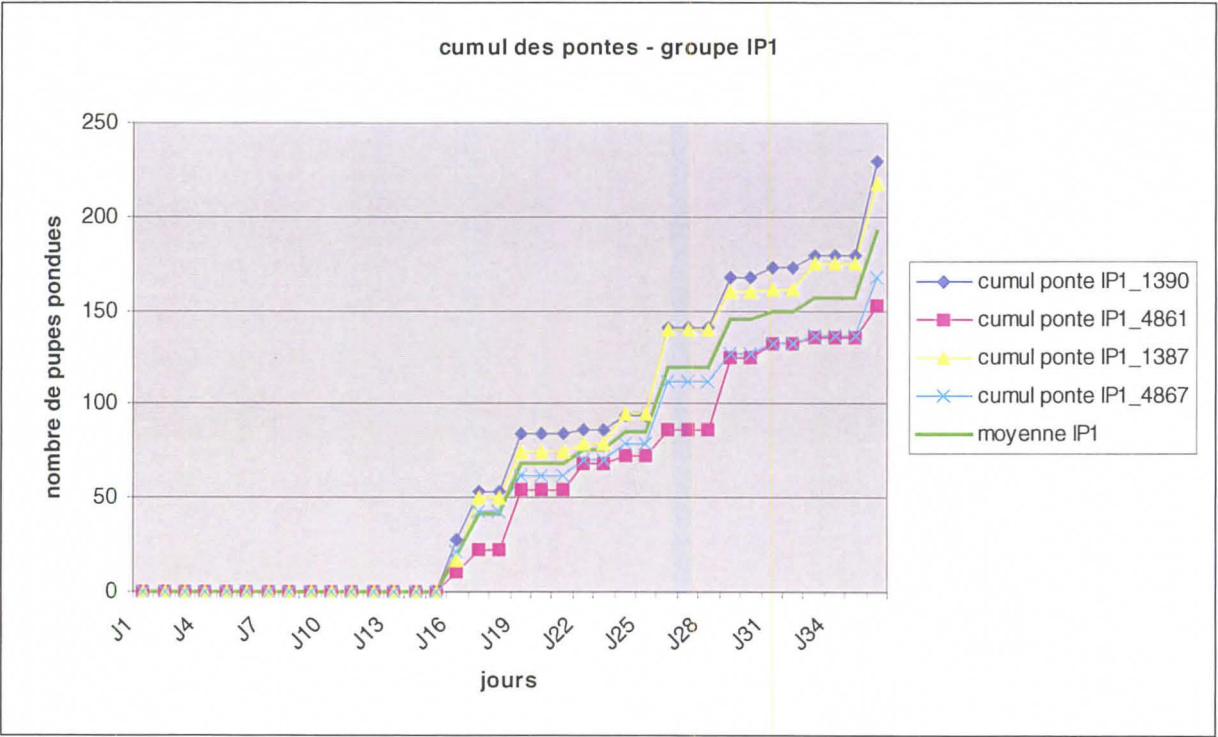


Figure 34 : cumul de ponte du groupe IP, lors du challenge 1

2.2.3.5 Comparaison des moyennes des cumuls de pontes des groupes du challenge 1

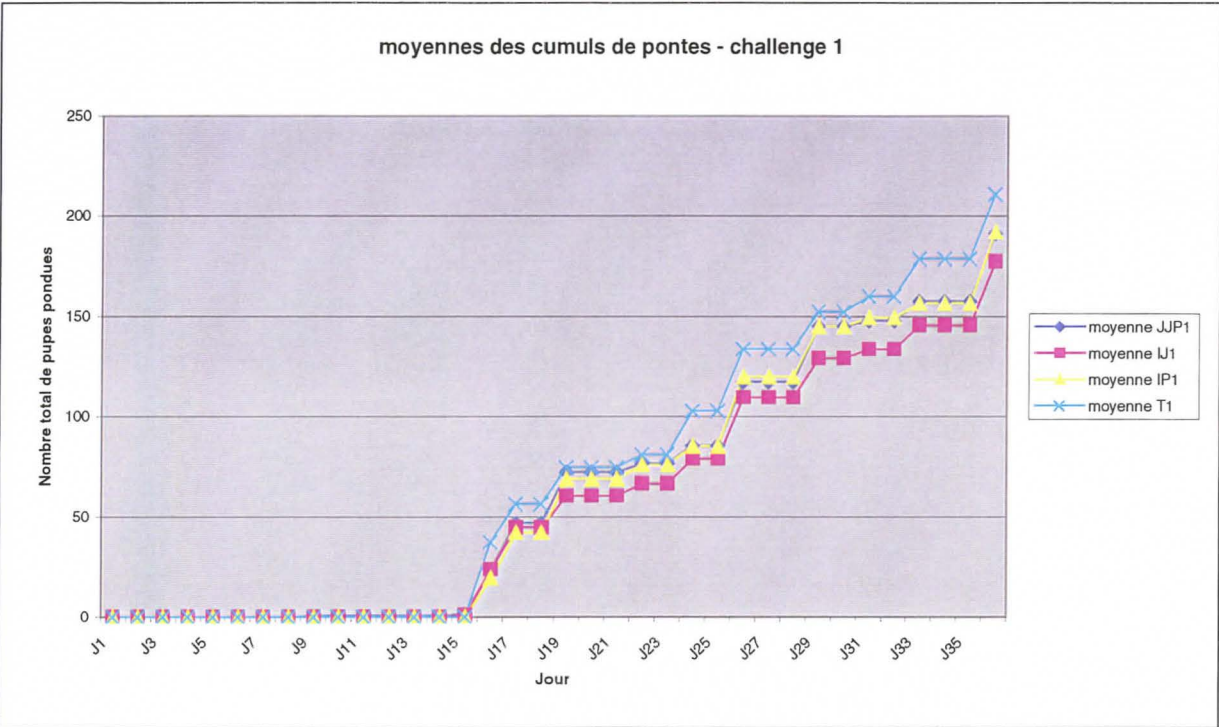


Figure 35 : moyennes des cumuls de ponte des différents groupes du challenge 1

Les moyennes des cumuls de pontes des lots des groupes JJP1, IJ1 et IP1 ont été comparées à celle des lots du groupe T1 grâce à la formule détaillée dans la partie Matériels et Méthode.

Après analyse statistique, il s'avère que la différence observée n'est pas significative à 5% entre, respectivement, les lots JJP1 et T1, les lots IJ1 et T1, et les lots IP1 et T1.

### 2.2.4. Taux de ponte

La comparaison statistique des taux de ponte des groupes nourris sur les bovins immunisés, avec celui du groupe témoin, ne révèle pas de différence significative au seuil de 5%.

### 2.2.5. Poids des pupes

Les moyennes des taux de pontes des lots des groupes JJP1, IJ1 et IP1 ont été comparées à celle des lots du groupe T1.

L'analyse statistique a révélé que la différence observée entre respectivement, les lots JJP1 et T1, les lots IJ1 et T1, et les lots IP1 et T1, n'est pas significative à 5%.

## 2.3. CHALLENGE 2



(cf. annexe 6)

2.3.1. Résultats

Le challenge 2 a commencé 25 jours après la dernière injection immunisante et a duré 5 semaines.

Les résultats enregistrés au cours de cette période sont présentés ci-dessous :

2.3.1.1 Suivi du groupe T2

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
T2 5679	43	149	177,3	25,0
T2 5498	32	188	212,3	24,3
T2 5684	25	232	248,1	26,1
T2 1380	16	238	250,8	25,0
Moyenne du groupe T	29	201,8	223,5	25,1

Figure 36 : résultats du groupe témoin pour le challenge 2

2.3.1.2 Suivi du groupe JJP2

Lot de mouches	Taux de mortalité (%) à J35	Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ	Taux de ponte (%)	Poids moyen des pupes
JJP2 5699	47	177	195,4	23,3
JJP2 5677	13	192	203,2	25,0

<b>Moyenne du groupe JJP</b>	30	184,5	199,4	24,1
------------------------------	----	-------	-------	------

Figure 37 : résultats du groupe JJP pour le challenge 2

2.3.1.3 Suivi du groupe IJ2

<b>Lot de mouches</b>	<b>Taux de mortalité (%) à J35</b>	<b>Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ</b>	<b>Taux de ponte (%)</b>	<b>Poids moyen des pupes</b>
<b>IJ2 5694</b>	47	109	123,7	21,9
<b>IJ2 5700</b>	38	183	211,1	24,2
<b>IJ2 4908</b>	20	232	247	25,6
<b>IJ2 5296</b>	32	198	219,6	24,9
<b>Moyenne du groupe IJ</b>	34,3	180,5	201,2	24,2

Figure 38 : résultats du groupe IJ pour le challenge 2

2.3.1.4 Suivi du groupe IP2

<b>Lot de mouches</b>	<b>Taux de mortalité (%) à J35</b>	<b>Nombre de pupes pondues/ 100 femelles gorgées au départ</b>	<b>Taux de ponte (%)</b>	<b>Poids moyen des pupes</b>
<b>IP2 1390</b>	36	179	205,3	25,0
<b>IP2 4861</b>	47	104	125,8	22,1
<b>IP2 1387</b>	24	197	208,1	26,1
<b>IP2 4867</b>	37	196	219,5	24,6
<b>Moyenne du groupe IP</b>	36	169	191,1	24,4

Figure 39 : résultats du groupe IP pour le challenge 2

2.3.1.5 Comparaison des moyennes des groupes du challenge 2

<b>Lot de mouches</b>	<b>Taux de mortalité (%) à J35</b>	<b>Nombre de pupes pondues/ 100</b>	<b>Taux de ponte (%)</b>	<b>Poids moyen des pupes</b>
-----------------------	------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------	------------------------------

		femelles gorgées au départ		
Moyenne JJP2	30	184,5	199,4	24,1
Moyenne IJ2	34,3	180,5	201,2	24,2
Moyenne IP2	36	169	191,1	24,4
Moyenne T2	29	201,8	223,5	25,1

Figure 40 : moyennes des différents groupe pour le challenge 2

2.3.2. Taux de mortalité

Les courbes de survie des différents groupes sont les suivantes :

2.3.2.1 Groupe T2

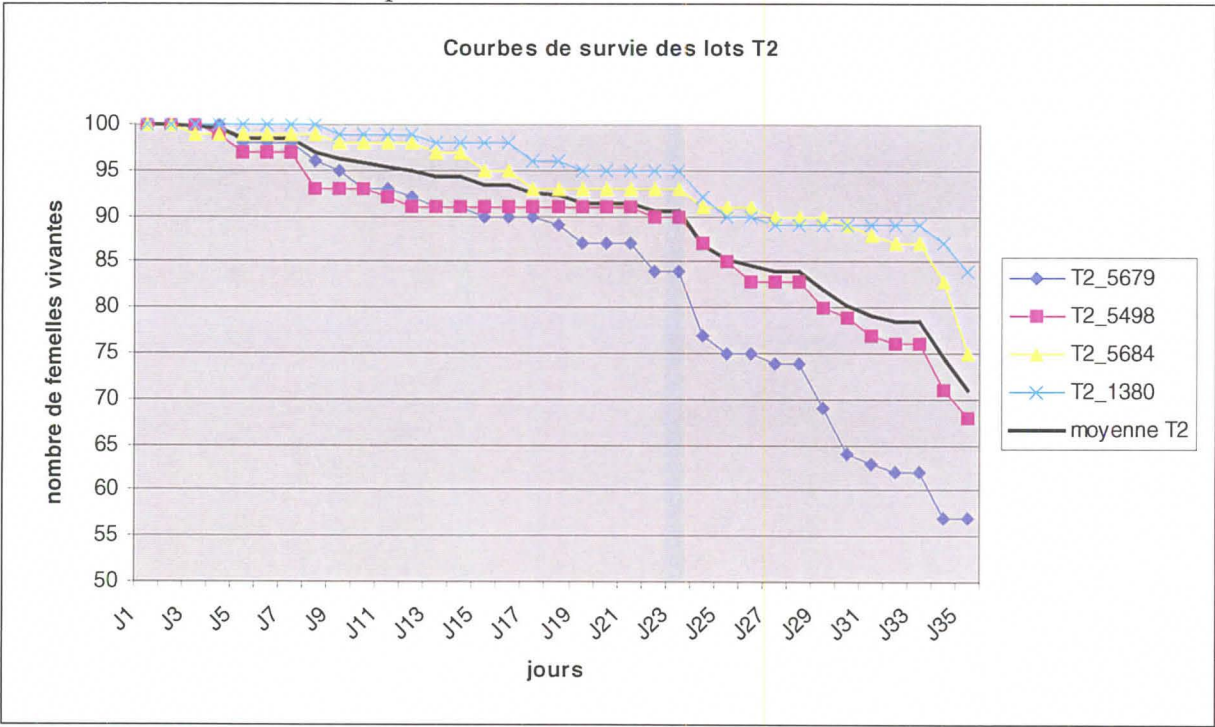


Figure 41 : courbes de survie du groupe témoin lors du challenge 2

Les taux de mortalité des lots du groupe T2 sont beaucoup moins homogènes que ceux des lots témoins du premier challenge.

2.3.2.2 Groupe JJP2



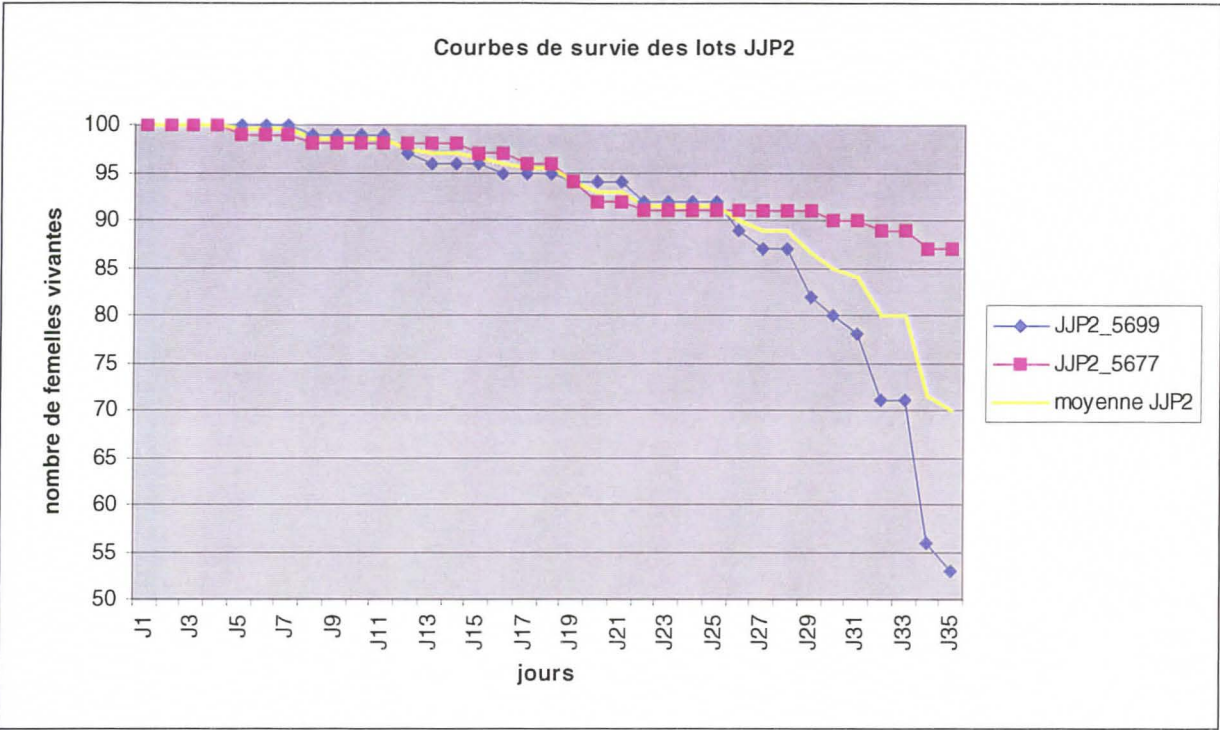


Figure 42 : courbes de survie du groupe JJP lors du challenge 2

Les taux de mortalité observés dans les deux lots du groupe JJP2 sont très différents. Les courbes de survie montrent que la différence est surtout importante à la fin du challenge 2, à partir de J25.

2.3.2.3 Groupe IJ2

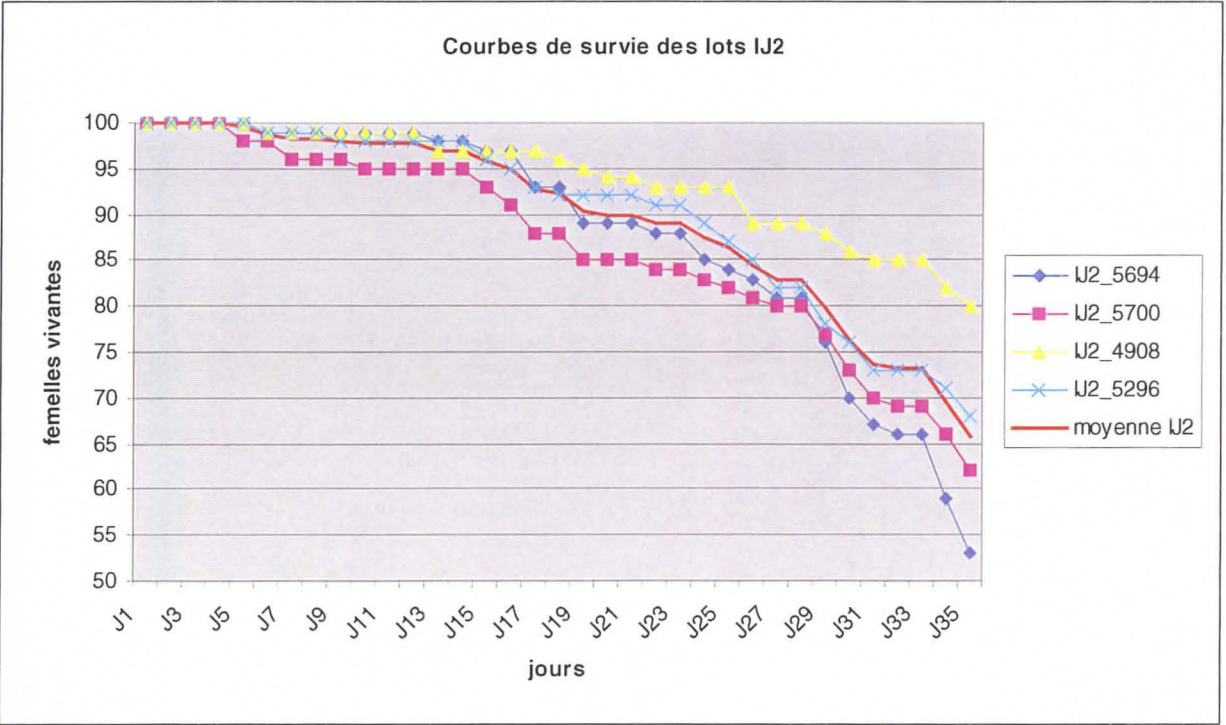


Figure 43 : courbes de survie du groupe IJ lors du challenge 2

Dans le groupe IJ2, la variabilité entre les lots est grande. La mortalité du lot IJ2\_4908 est inférieure à la moyenne de mortalité des 4 lots.

2.3.2.4 Groupe IP2

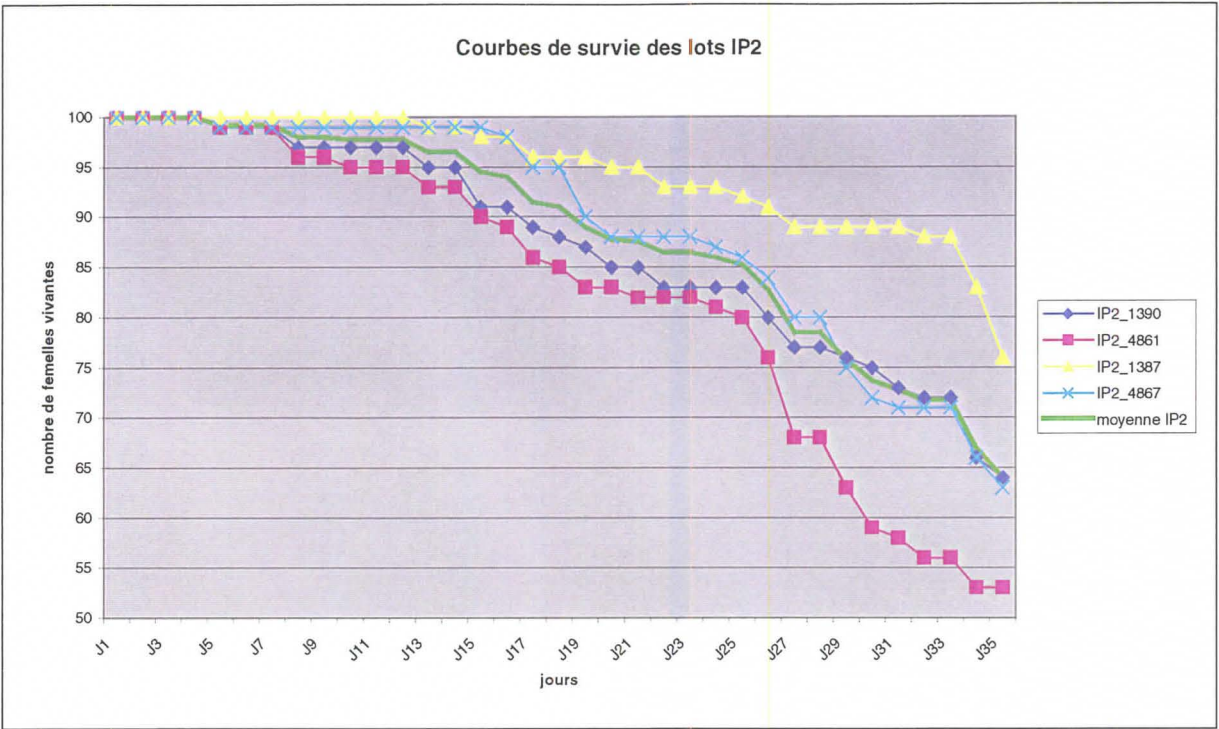


Figure 44 : courbes de survie du groupe IP lors du challenge 2

Parmi les lots du groupe IP2, il est à noter que la mortalité du lot IP2\_1387 est faible, tandis que celle du lot IP2\_4861 est importante, ceci par rapport à la moyenne du groupe.

2.3.2.5 Comparaison des taux de mortalités des groupes du challenge 2

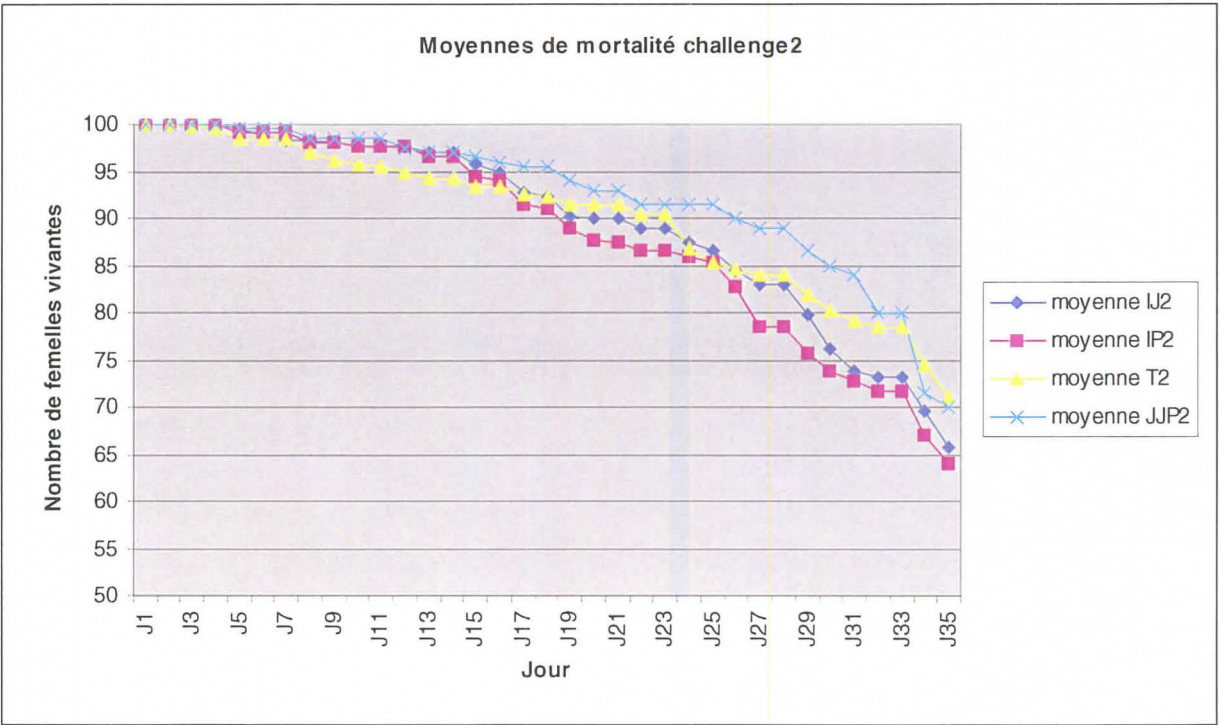


Figure 45 : courbes moyennes de survie des différents groupes du challenge 2

Les taux de mortalité des lots de mouches nourries sur les bovins des différents groupes immunisés ont été comparés à celui des lots nourris sur les animaux du groupe témoin.

Le test utilisé pour faire cette comparaison de pourcentages est le Test de l'écart réduit.

L'analyse statistique des résultats a révélé que les différences observées entre les différents lots des groupes immunisés et ceux du groupe témoin ne sont pas significatives à 5%.

### 2.3.3. Cumul de ponte

Les représentations graphiques des cumuls de pontes sont les suivantes :

#### 2.3.3.1 Groupe T2

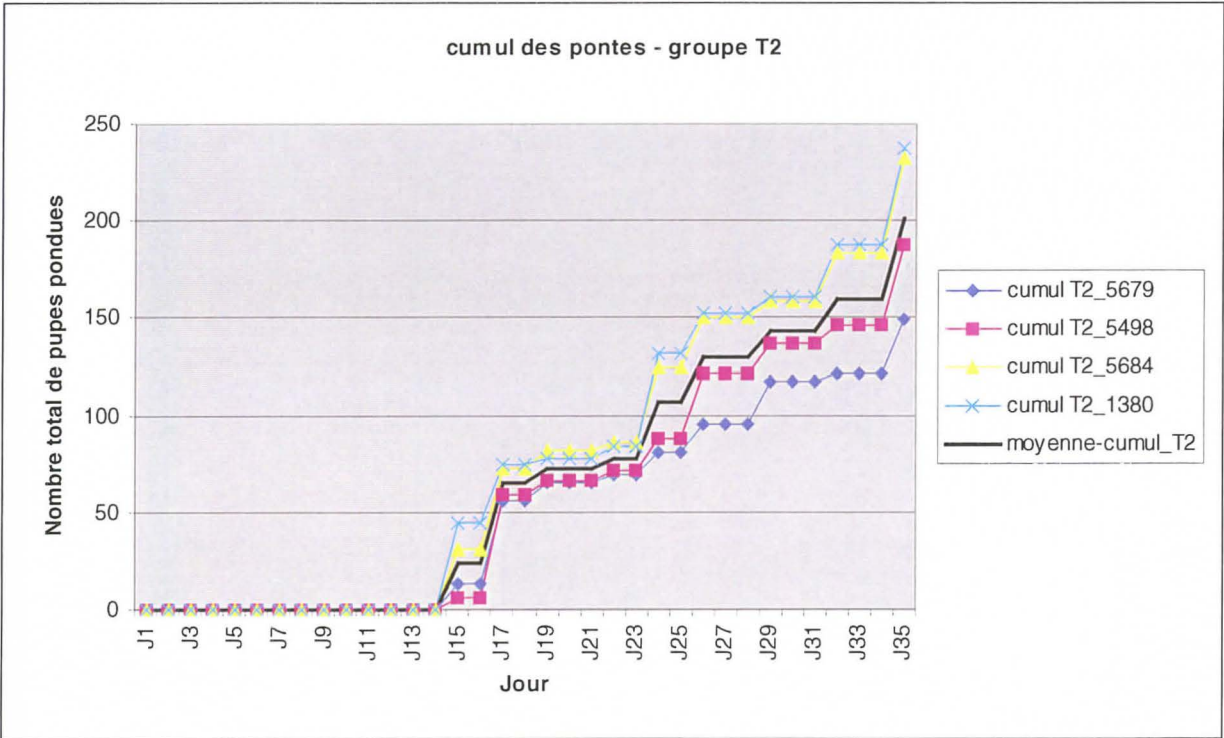


Figure 46 : cumul de ponte du groupe témoin pour le challenge 2

#### 2.3.3.2 Groupe JJP2



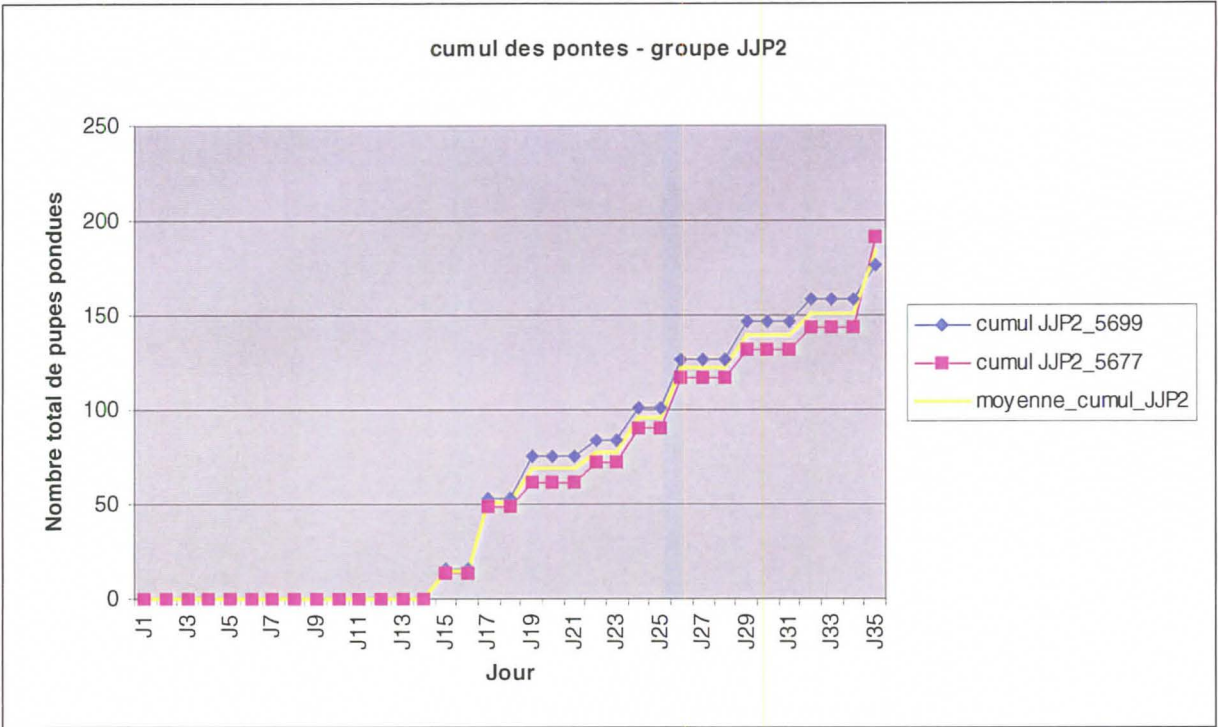


Figure 47: cumul de ponte du groupe JJP pour le challenge 2  
2.3.3.3 Groupe IJ2

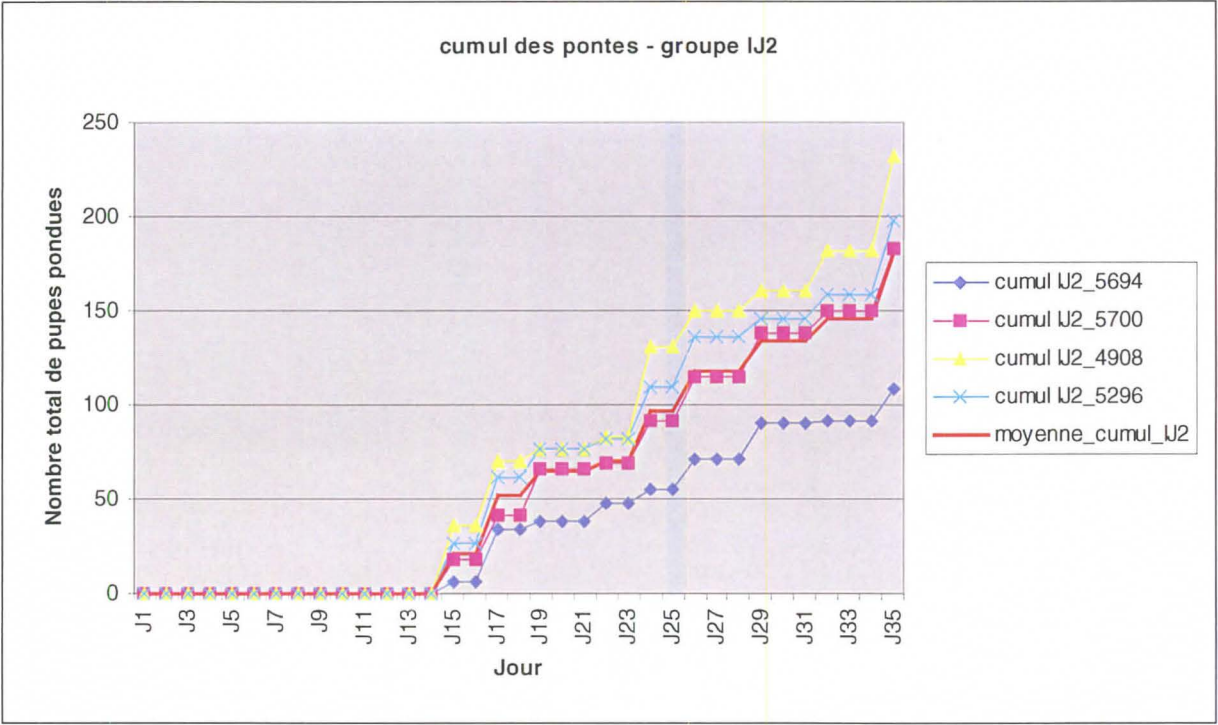


Figure 48 : cumul de ponte du groupe IJ pour le challenge 2

2.3.3.4 Groupe IP2

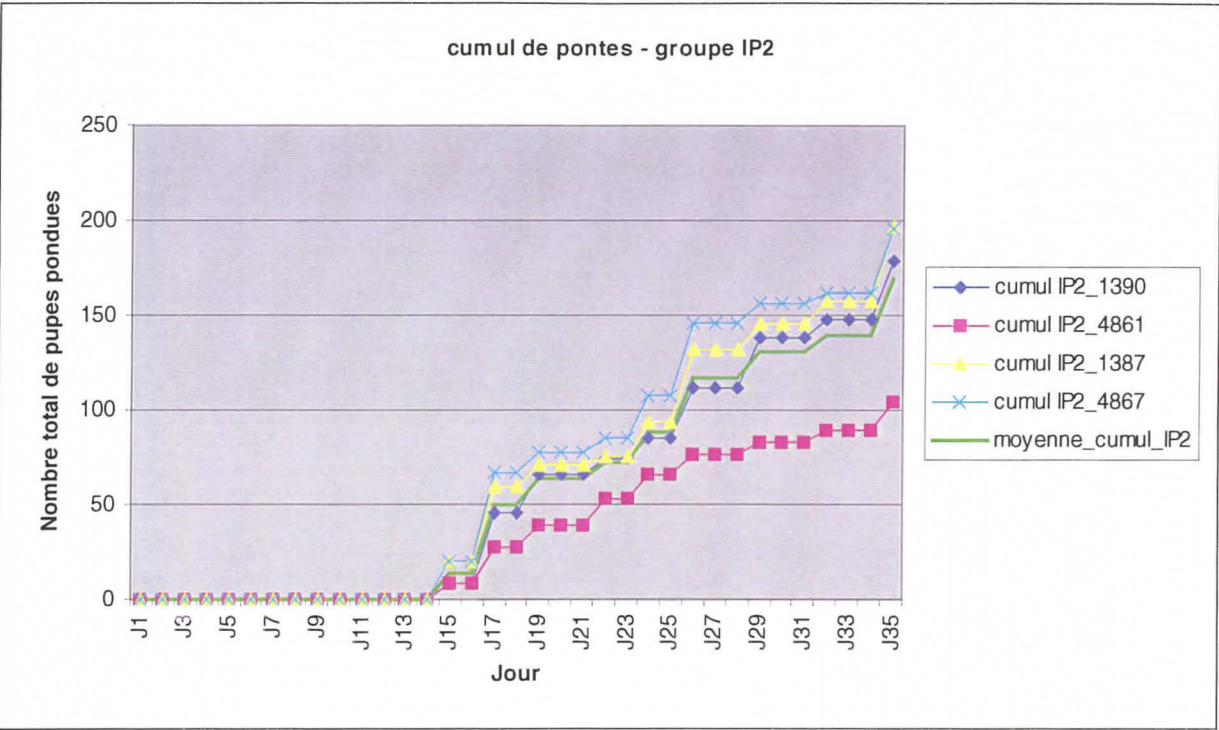


Figure 49 : cumul de ponte du groupe IP pour le challenge 2

2.3.3.5 Comparaison des moyennes des cumuls de ponte des groupes du challenge 2

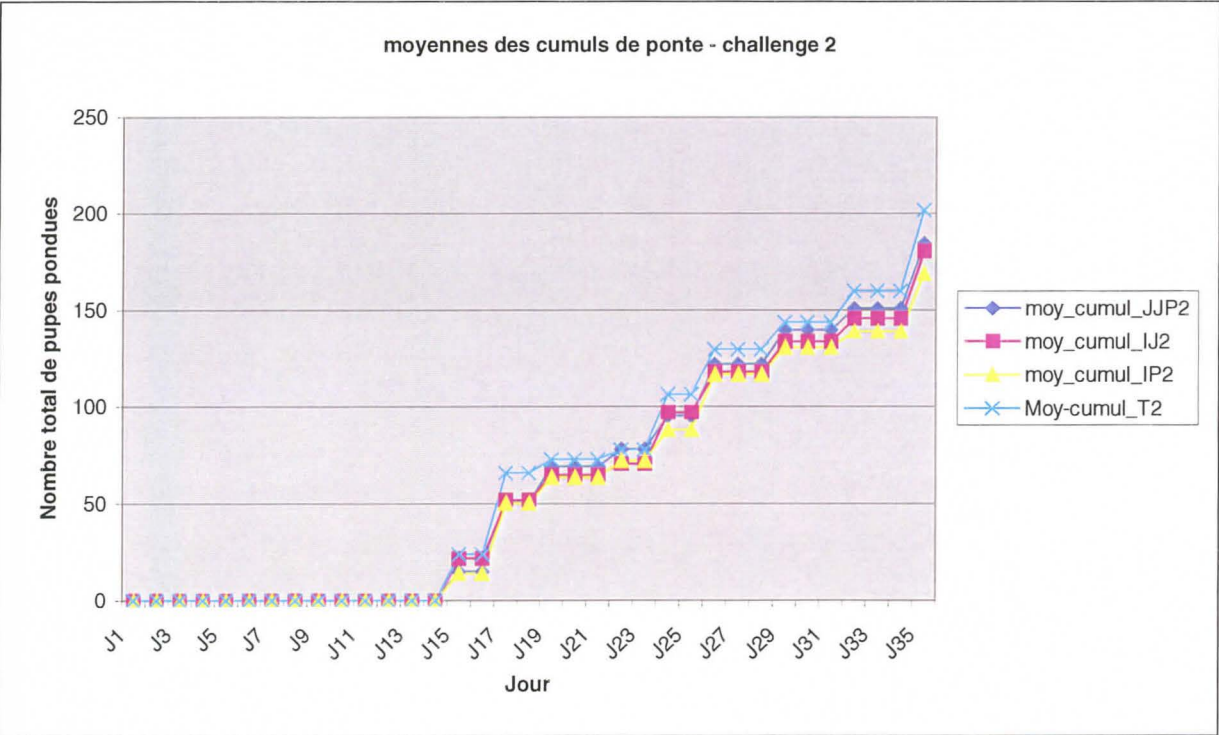


Figure 50 : moyennes de cumuls de ponte des différents groupes du challenge 2

Les moyennes des cumuls de pontes des lots des groupes JJP2, IJ2 et IP2 ont été comparées à celle des lots du groupe T2.

Après analyse statistique, il s'avère que les différences observées ne sont pas significatives à 5% entre, respectivement, les lots JJP2 et T2, les lots IJ2 et T2, et les lots IP2 et T2.

#### **2.3.4. Taux de ponte**

Les taux de ponte des groupes JJP2, IJ2 et IP2 ont été comparés à celui du groupe T2.

L'analyse statistique révèle qu'il n'existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les différents groupes du challenge 2.

#### **2.3.5. Poids des pupes**

Les poids moyens des pupes des groupes JJP, IJ et IP du challenge 2 ont été comparés à celle des lots du groupe T2.

L'analyse statistique a révélé que les différences observées entre les lots JJP2, IJ2 et IP2 d'une part, et T2 d'autre part, ne sont pas significatives à 5%.

### **2.4. CHALLENGE HORIZONTAL**

(cf. annexe 7)

#### **2.4.1. Taux de mortalité à J30**



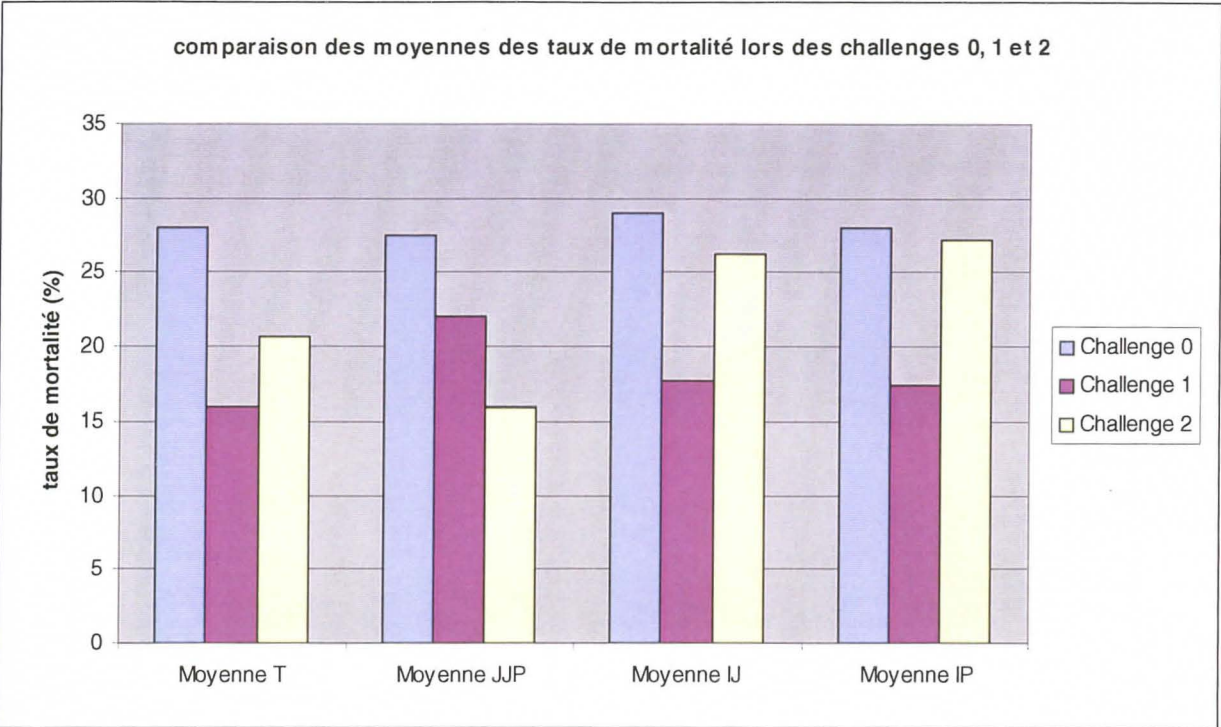


Figure 51 : moyennes des taux de mortalités des différents groupes au cours des challenges 0, 1 et 2

2.4.1.1 Groupe T

Numéro du lot	Challenge 0	Challenge 1	Challenge 2
T_5679	31	17	37
T_5498	26	15	23
T_5684	37	13	12
T_1380	18	19	11
Moyenne du groupe T	28	16	20,8

Figure 52 : taux de mortalité du groupe témoin au cours des challenges 0, 1 et 2

L'analyse statistique a révélé qu'il n'existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les taux de mortalité du groupe T des challenges 0, 1 et 2.

2.4.1.2 Groupe JJP

Numéro du lot	Challenge 0	Challenge 1	Challenge 2
JJP_5699	26	31	22
JJP_5677	29	13	10
Moyenne du groupe JJP	27,5	22	16

Figure 53 : taux de mortalité du groupe JJP au cours des challenges 0, 1 et 2

Les différences observées entre les taux de mortalité du groupe JJP lors des challenges 0, 1 et 2 ne sont pas significatives au seuil de 5%.

2.4.1.3 Groupe IJ

Numéro du lot	Challenge 0	Challenge 1	Challenge 2
IJ_5694	29	20	33
IJ_5700	30	32	30

IJ_4908	36	6	15
IJ_5296	21	13	27
Mortalité du groupe IJ	29	17,8	26,3

Figure 54 : taux de mortalité du groupe IJ au cours des challenges 0, 1 et 2

Après analyse statistique, il s'avère que les différences entre les taux de mortalité observés lors des challenges 0, 1 et 2 ne sont pas significatives, au sein du groupe IJ.

2.4.1.4 Groupe IP

Numéro du lot	Challenge 0	Challenge 1	Challenge 2
IP_1390	28	11	27
IP_4861	22	15	42
IP_1387	29	16	11
IP_4867	33	28	29
Moyenne du groupe IP	28	17,5	27,3

Figure 55 : taux de mortalité du groupe IP au cours des challenges 0, 1 et 2

Il n'existe pas de différence statistiquement significative au seuil de 5% entre les taux de mortalité du groupe IP observés lors des challenges 0, 1 et 2.

2.4.2. Cumul de ponte

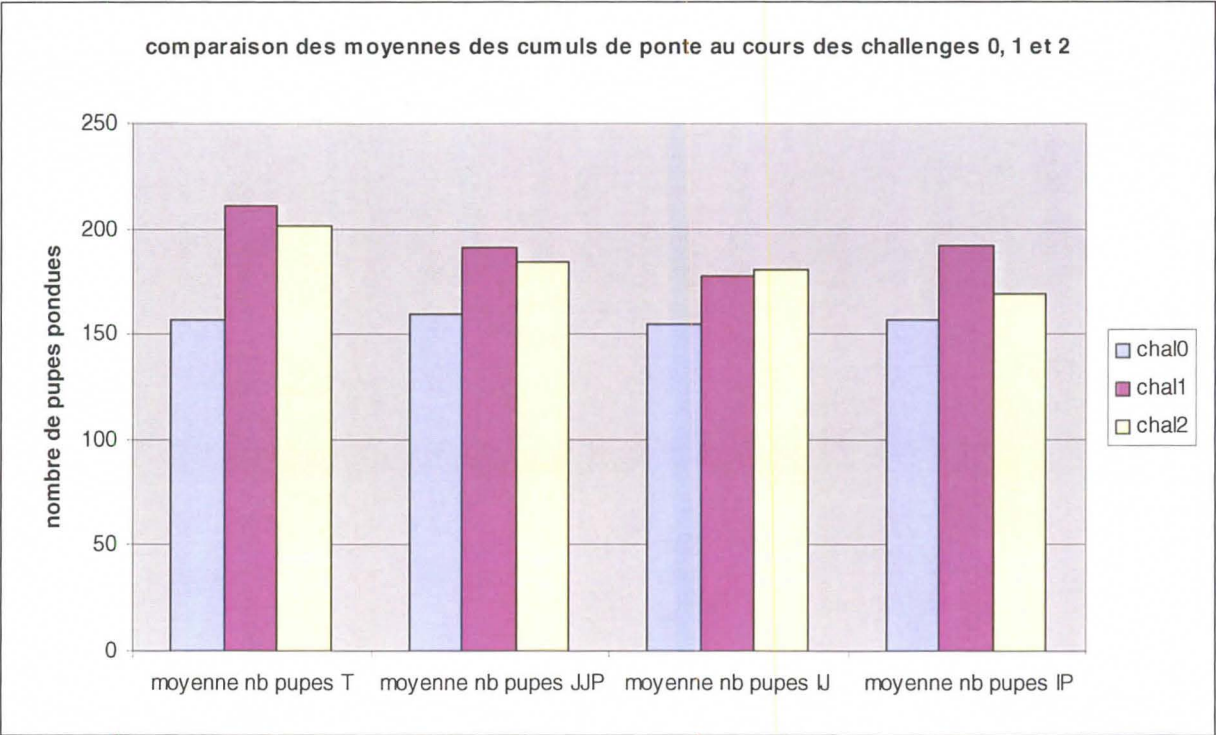


Figure 56 : moyennes des cumuls de ponte des différents groupes au cours des challenges 0, 1 et 2

2.4.2.1 Groupe T

Numéro du lot	Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 0 -	Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 1 -	Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 2 -
T_5679	143	187	149

<b>T_5498</b>	164	208	188
<b>T_5684</b>	144	215	232
<b>T_1380</b>	178	234	238
<b>Moyenne du groupe T</b>	157,3	211	201,8

Figure 57 : cumuls de ponte du groupe témoin lors des challenges 0, 1 et 2

L’analyse statistique révèle qu’il existe au sein du groupe témoin une augmentation significative du nombre de pupes pondues par 100 femelles gorgées au départ entre le challenge 0 et le challenge 1.

Il n’y a en revanche pas de différence statistiquement significative entre les résultats des challenges 0 et 2, ainsi qu’1 et 2.

2.4.2.2 Groupe JJP

<b>Numéro du lot</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 0 -</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 1 -</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 2 -</b>
<b>JJP_5699</b>	176	157	177
<b>JJP_5677</b>	144	226	192
<b>Moyenne du groupe JJP</b>	160	191,5	184,5

Figure 58 : cumuls de ponte du groupe JJP lors des challenges 0, 1 et 2

D’après l’analyse statistique, il n’existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les observations des challenges 0, 1 et 2 pour le groupe JJP. Ce résultat diffère de celui obtenu pour le lot témoin.

2.4.2.3 Groupe IJ

<b>Numéro du lot</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 0 -</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 1 -</b>	<b>Nombre de pupes pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 2 -</b>
<b>IJ_5694</b>	158	117	109
<b>IJ_5700</b>	130	152	183
<b>IJ_4908</b>	172	232	232
<b>IJ_5296</b>	159	209	198
<b>Moyenne du groupe IJ</b>	154,8	177,5	180,5

Figure 59 : cumuls de ponte du groupe IJ lors des challenges 0, 1 et 2

A la différence du groupe témoin, il n’existe pas de différence statistiquement significative au seuil de 5% entre les observations faites au cours des challenges 0, 1 et 2 pour le groupe IJ.

2.4.2.4 Groupe IP

<b>Numéro du lot</b>	<b>Nombre de pupes</b>	<b>Nombre de pupes</b>	<b>Nombre de pupes</b>
----------------------	------------------------	------------------------	------------------------



	pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 0 -	pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 1 -	pondues / 100 femelles gorgées au départ - challenge 2 -
IP_1390	155	230	179
IP_4861	172	153	104
IP_1387	158	218	197
IP_4867	141	168	196
Moyenne du groupe IP	156,5	192,3	169

Figure 60 : cumuls de ponte du groupe IP lors des challenges 0, 1 et 2

L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les résultats des challenges 0, 1 et 2 du groupe IP. Ce résultat diffère de celui du groupe témoin.

2.4.3. Taux de ponte

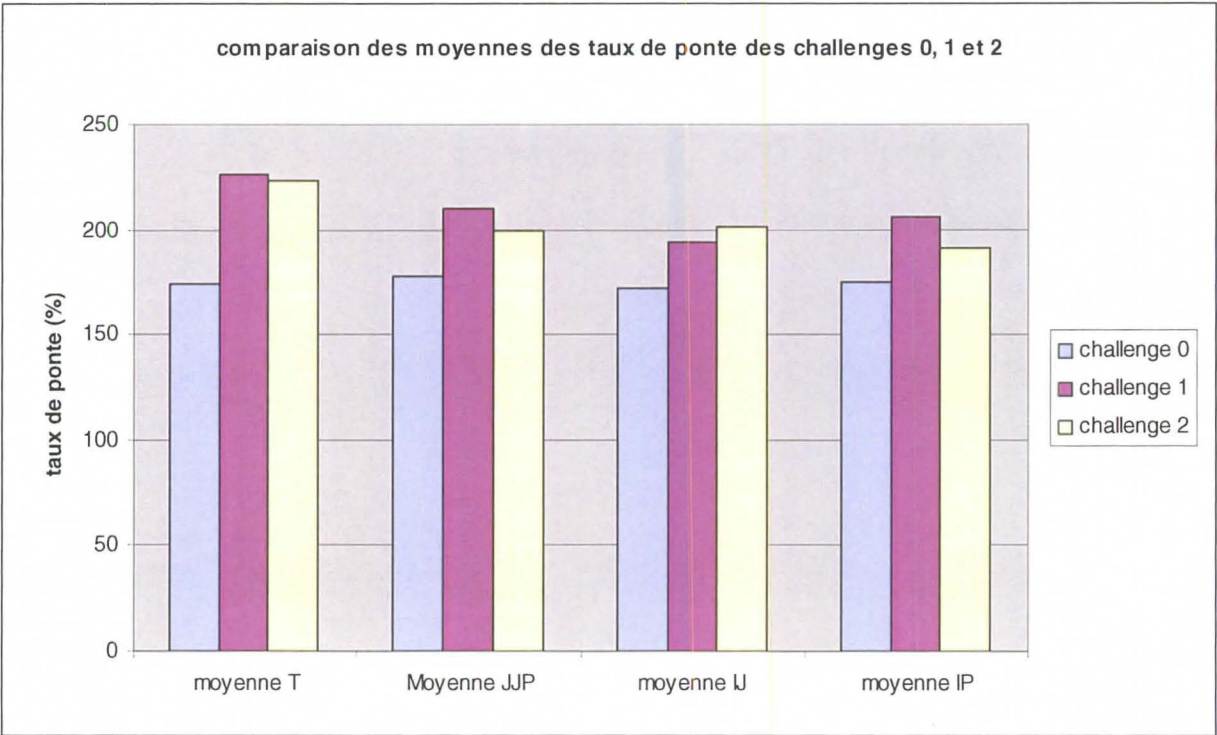


Figure 61 : moyennes des taux de ponte des différents groupes au cours des challenges 0, 1 et 2

2.4.3.1 Groupe T

Numéro du lot	Taux de ponte - challenge 0-	Taux de ponte - challenge 1-	Taux de ponte - challenge 2-
T_5679	160	203,2	177,3
T_5498	183,5	223,2	212,3
T_5684	163,6	226,6	248,1

<b>T_1380</b>	188,5	250,2	250,8
<b>Moyenne du groupe T</b>	174,1	225,9	223,5

Figure 62 : taux de ponte du groupe témoin au cours des challenges 0, 1 et 2

La comparaison des différents taux de ponte du groupe T révèle qu’il existe une augmentation significative du taux de ponte entre le challenge 0 et le challenge 1.

Les différences observées entre les taux de ponte des challenges 0 et 2, ainsi que 1 et 2 ne sont en revanche pas significatives au seuil de 5%.

2.4.3.2 Groupe JJP

Numéro du lot	Taux de ponte - challenge 0-	Taux de ponte - challenge 1-	Taux de ponte - challenge 2-
<b>JJP_5699</b>	193,1	179,6	195,4
<b>JJP_5677</b>	162,3	238,2	203,2
<b>Moyenne du groupe JJP</b>	177,9	210,1	199,4

Figure 63 : taux de ponte du groupe JJP au cours des challenges 0, 1 et 2

L’analyse statistique montre que les différences observées lors des 3 challenges ne sont statistiquement pas significatives.

Le résultat du groupe JJP diffère donc de celui du groupe témoin.

2.4.3.3 Groupe IJ

Numéro du lot	Taux de ponte - challenge 0-	Taux de ponte - challenge 1-	Taux de ponte - challenge 2-
<b>IJ_5694</b>	174,3	128	123,7
<b>IJ_5700</b>	145,6	182,3	211,1
<b>IJ_4908</b>	194,7	239,5	247
<b>IJ_5296</b>	172,2	220,3	219,6
<b>Moyenne du groupe IJ</b>	171,7	193,7	201,2

Figure 64 : taux de ponte du groupe IJ au cours des challenges 0, 1 et 2

D’après l’analyse statistique, les différences observées entre les taux de ponte du groupe IJ au cours des 3 challenges ne sont pas significatives au seuil de 5%.

2.4.3.4 Groupe IP

Numéro du lot	Taux de ponte - challenge 0-	Taux de ponte - challenge 1-	Taux de ponte - challenge 2-
<b>IP_1390</b>	160	240,7	205,3
<b>IP_4861</b>	183,5	161,4	125,8
<b>IP_1387</b>	163,6	230,4	208,1
<b>IP_4867</b>	188,5	191,7	219,5

Moyenne du groupe IP	174,1	206,4	191,1
----------------------	-------	-------	-------

Figure 65 : taux de ponte du groupe IP au cours des challenges 0, 1 et 2

A la différence du groupe témoin, les écarts observés entre les taux de ponte du groupe IP lors des challenges 0, 1 et 2 ne sont statistiquement pas significatives.

2.4.4. Poids des pupes

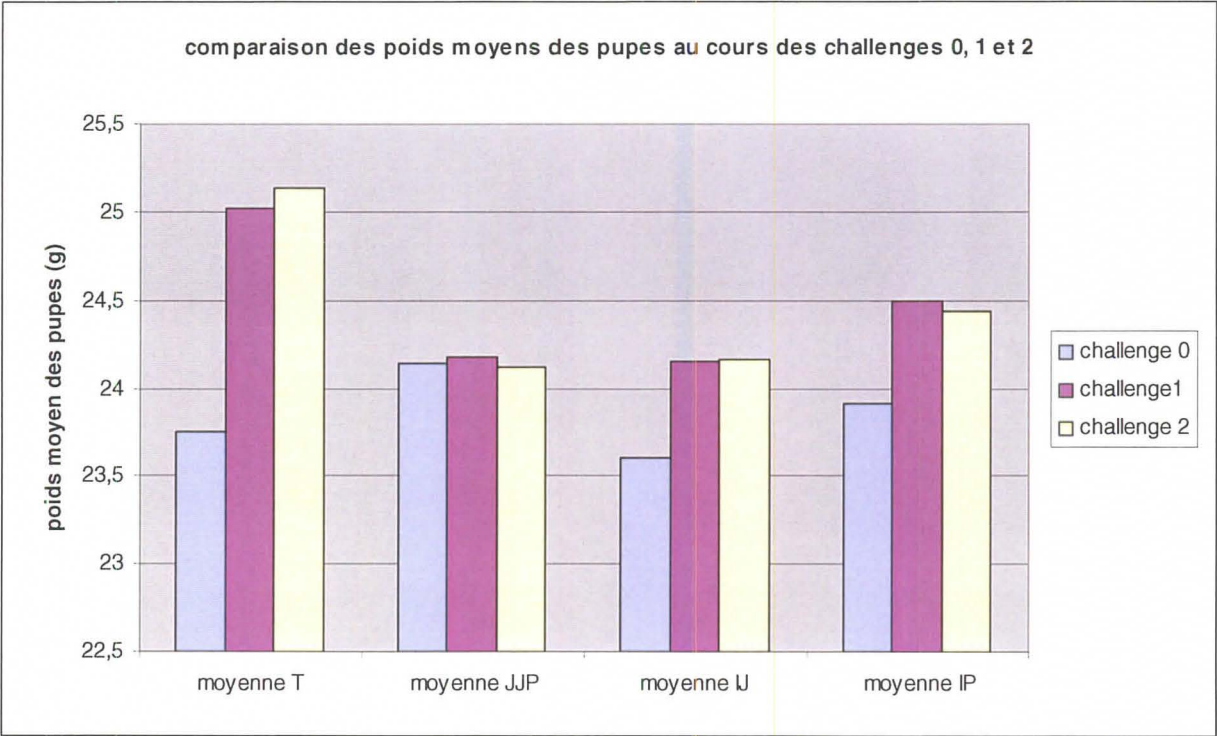


Figure 66 : moyennes des poids des pupes des différents groupes au cours des challenges 0, 1 et 2

2.4.4.1 Groupe T

Numéro du lot	Poids moyen des pupes – challenge 0 -	Poids moyen des pupes – challenge 1 -	Poids moyen des pupes – challenge 2 -
T_5679	23,3	23,8	25
T_5498	23,5	25,3	24,3
T_5684	23,5	25,4	26,1
T_1380	24,6	25,6	25
Moyenne du groupe T	23,8	25	25,1

Figure 67 : poids moyens des pupes du groupe témoin au cours des challenges 0, 1 et 2

L’analyse statistique révèle qu’il existe, au sein du groupe témoin, une augmentation significative du poids des pupes entre le challenge 0 et le challenge 2.

Les différences observées entre les challenges 0 et 1, et 1 et 2 ne sont pas significatives au seuil de 5%.

2.4.4.2 Groupe JJP



Numéro du lot	Poids moyen des pupes – challenge 0 -	Poids moyen des pupes – challenge 1 -	Poids moyen des pupes – challenge 2 -
JJP_5699	24,5	23,4	23,3
JJP_5677	23,8	25	25
Moyenne du groupe JJP	24,1	24,2	24,1

Figure 68 : poids moyens des pupes du groupe JJP au cours des challenges 0, 1 et 2

Les différences observées entre les poids moyens des pupes du groupe JJP, lors des challenges 0, 1 et 2, ne sont pas significatives au seuil de 5%. Ceci diffère de ce qui est constaté pour le groupe témoin.

2.4.4.3 Groupe IJ

Numéro du lot	Poids moyen des pupes – challenge 0 -	Poids moyen des pupes – challenge 1 -	Poids moyen des pupes – challenge 2 -
IJ_5694	23,6	23,8	21,9
IJ_5700	22,6	23,5	24,2
IJ_4908	25,2	25,5	25,6
IJ_5296	23	23,9	24,9
Moyenne du groupe IJ	23,6	24,2	24,2

Figure 69 : poids moyens des pupes du groupe IJ au cours des challenges 0, 1 et 2

A la différence de ce qui est observé pour le groupe témoin, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les poids moyens des pupes du groupe IJ, au cours des challenges 0, 1 et 2.

2.4.4.4 Groupe IP

Numéro du lot	Poids moyen des pupes – challenge 0 -	Poids moyen des pupes – challenge 1 -	Poids moyen des pupes – challenge 2 -
IP_1390	23,9	25,2	25
IP_4861	23,6	23,2	22,1
IP_1387	24,7	24,7	26,1
IP_4867	23,4	24,9	24,6
Moyenne du groupe IP	23,9	24,5	24,4

Figure 70 : poids moyens des pupes du groupe IP au cours des challenges 0, 1 et 2

Les différences observées au sein du groupe IP, lors des challenges 0, 1 et 2 ne sont statistiquement pas significatives au seuil de 5%. Ce résultat diffère de celui obtenu pour le groupe témoin.

2.2.DISTINCTION DE DEUX GROUPES DE BOVINS

Les résultats obtenus au cours des challenges 1 et 2 laissent paraître une grande variabilité individuelle.

A première vue, au sein de chaque groupe JJP, IJ ou IP, il semble que les performances des mouches nourries sur certains animaux aient été plus altérées.

Nous avons tenté de distinguer deux groupes de bovins pour chaque challenge, indépendamment de la fraction avec laquelle les animaux ont été inoculés :

- Un groupe pour lequel les performances des mouches nourries sur les bovins sont peu diminuées par rapport aux lots témoins
- Un groupe pour lequel les performances des mouches sont nettement diminuées.

### 2.5.1. Challenge 1

(cf. annexe 8)

#### 2.5.1.1 Taux de mortalité

Les taux de mortalité des lots nourris sur les animaux JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867 semblent plus forts que pour le reste des lots.

L'analyse statistique avec un test de Student révèle qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre le taux moyen de mortalité observé sur ces trois lots, et le taux moyen de mortalité observé sur les 7 autres lots de mouches nourries sur des bovins vaccinés.

#### 2.5.1.2 Cumul de ponte

La moyenne des cumuls de ponte des mouches nourries sur les bovins JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, IJ\_5694, IP\_4861 a été comparée à celle des lots nourris sur les animaux JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387.

Le test de Student corrigé permet de conclure que la moyenne du premier groupe est significativement inférieure à celle du deuxième groupe.

#### 2.5.1.3 Taux de ponte

Les moyennes des taux de ponte des mêmes groupes ont été comparés grâce au test de Student corrigé et diffèrent significativement, au seuil de 5%.

#### 2.5.1.4 Poids moyen des pupes

La moyenne du poids des pupes des lots nourris sur les animaux JJP\_5699, IJ\_5694, IJ\_5700, IJ\_5296, IP\_4861 est plus faible que celle des autres lots.

L'analyse statistique par un test de Student montre que cette différence est significative au seuil de 5%

Pour le challenge 1, il est finalement possible de distinguer deux groupes d'animaux :

- Les 5 bovins JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, IJ\_5694, IP\_4861, pour lesquels les performances des lots de mouches correspondant sont régulièrement diminuées et de manière significative

- Les 5 autres, JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390 et IP\_1387, pour lesquels les lots de mouches présentent de meilleurs résultats.

## 2.5.2. Challenge 2

(cf. annexe 9)

### 2.5.2.1 Taux de mortalité

Les taux de mortalité des lots nourris sur les bovins JJP\_5699, IJ\_5694 et IP\_4861 sont plus grands que ceux des autres lots.

La comparaison de la moyenne de ces trois lots à celle du reste des lots a été faite grâce au test de Student corrigé. Celui-ci permet de conclure à une différence statistiquement significative au seuil de 5%.

### 2.5.2.2 Cumul de ponte

Les cumuls de ponte correspondant aux bovins IJ\_5694 et IP\_4861 sont nettement inférieurs aux valeurs des autres lots.

La moyenne du groupe constitué par ces deux lots a été comparée à la moyenne des 8 lots restants. La différence entre ces moyennes est significative au seuil de 5%.

### 2.5.2.3 Taux de ponte

La moyenne des taux de ponte des deux même lots s'est révélée significativement inférieure à la moyenne des 8 autres lots, après avoir été analysée à l'aide d'un test de Student corrigé.

### 2.5.2.4 Poids moyen des pupes

Le poids moyen des pupes des mouches nourries sur les bovins JJP\_5699, IJ\_5694 et IP\_4861 est inférieur à celui des mouches nourries sur les autres bovins.

La comparaison des moyennes de ces deux groupes a été faite grâce au test de Student : la différence observée est significative au seuil de 5%.

L'analyse des résultats du challenge 2 permet donc de distinguer les deux groupes suivants :

- Les animaux JJP\_5677, IJ\_5700, IJ\_5296, IJ\_4908, IP\_1390, IP\_4867 et IP\_1387
- Les animaux JJP\_5699, IJ\_5694 et IP\_4861 pour lesquels les performances des mouches sont plus altérées.

## 2.3.SEROLOGIES ET WESTERN BLOTS

### 2.5.1. Sérologies

Les résultats du suivi des réponses sérologiques à l'immunisation ont été obtenus grâce à un test ELISA.

La figure suivante représente les profils sérologiques des animaux pour la fraction IP :



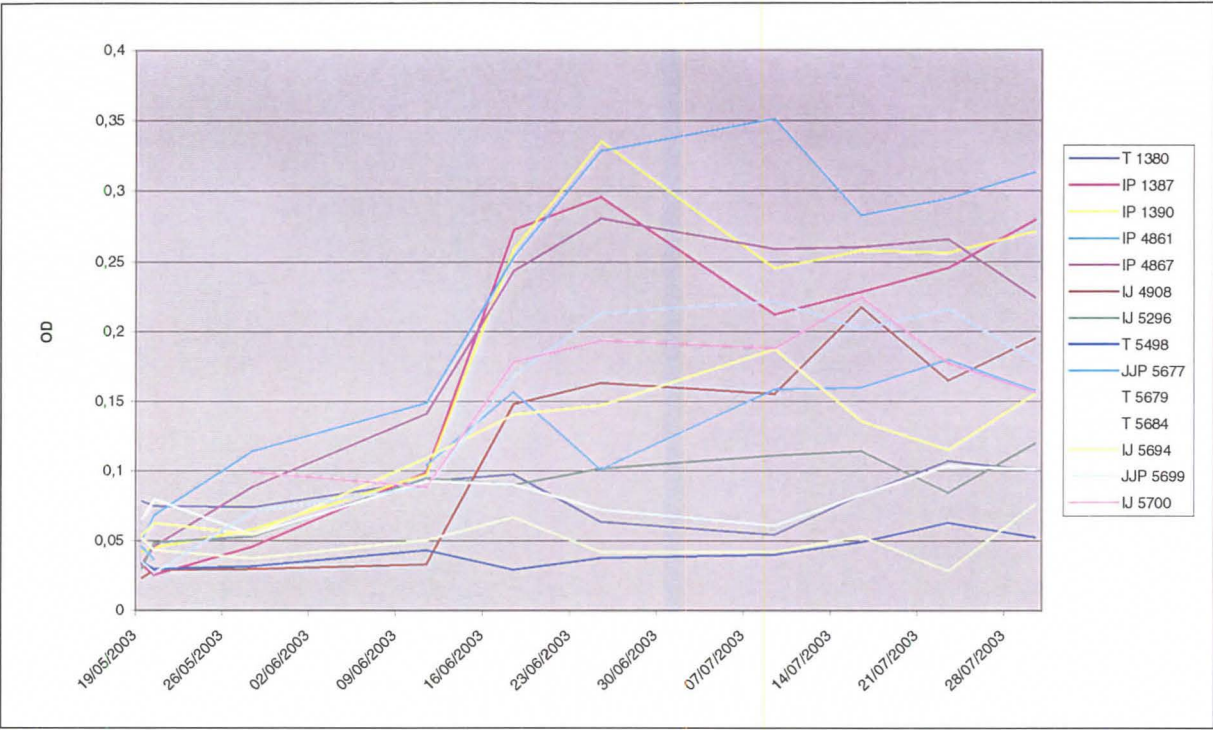


Figure 71 : suivi de la réponse humorale à l’immunisation par la fraction antigénique IP.

D’après la figure XX, la répartition des réponses humorales pour la fraction IP est logique.

Les 4 bovins vaccinés avec cette même fraction antigénique présentent les plus forts taux d’immunoglobulines. Les animaux témoins présentent les taux d’immunoglobulines les plus faibles, tandis que les bovins immunisés avec les fractions IJ et JJP présentent des taux intermédiaires.

Sur cette même figure, il apparaît que l’animal présentant le plus fort taux d’immunoglobulines anti-antigène IP est le bovin 4861. Les lots de mouches nourris sur cet animal sont ceux pour lesquels les effets sont les plus importants, en terme d’augmentation de mortalité et de baisse des performances de reproduction.

Ceci permet de penser que c’est bien l’antigène IP qui a provoqué la production d’anticorps anti-antigène IP, et que ces anticorps ont provoqué des effets délétères sur les glossines.

Les résultats obtenus pour les autres fractions antigéniques sont incohérents.

2.5.2. Western blots

Avant de réaliser les premiers western blots à partir des sérums des bovins, nous avons réalisé une électrophorèse des antigènes intestinaux. Le gel suivant a été obtenu :

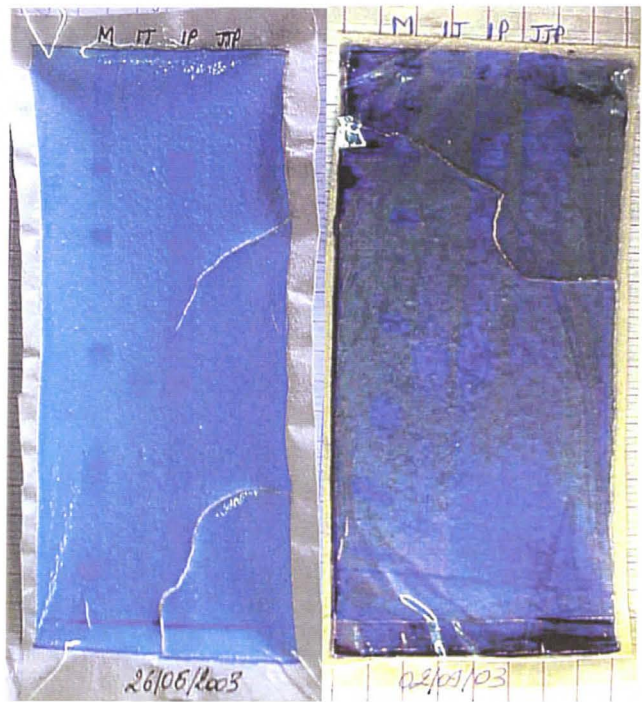


Figure 72 : électrophorèse des protéines IJ, IP et JJP, après coloration au Bleu de Coumassie. Les volumes déposés sont les suivants : 20  $\mu$ L de marqueur de poids moléculaire, 50  $\mu$ L de fraction IJ à 7 mg/mL, 50  $\mu$ L de fraction IP à 7 mg/mL, 70  $\mu$ L de fraction JJP à 3,5 mg/mL.

Il a fallu déposer des échantillons de grand volume pour obtenir ce gel, dont la qualité n'est pas très bonne. Il est possible que les antigènes ne soient pas de très bonne qualité, qu'un début de dégradation se soit opéré.

Les résultats des western blots se sont révélés très décevants.

Les membranes obtenues en suivant le protocole décrit en annexe ressemblent à celle présentée ci-dessous :

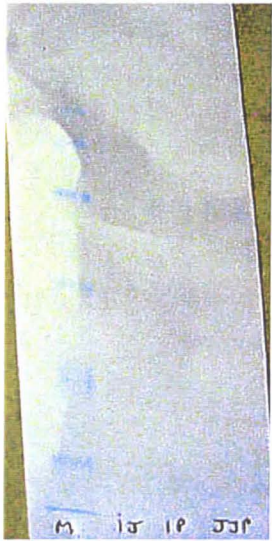


Figure 73 : western blot obtenu pour le bovin IP\_1387. Le sérum a été dilué au 1/100 et l'anticorps conjugué au 1/1000.

Tout au plus, nous avons observé des traces grisâtres autour de 32,5 kDa, mais pas de bande nette. La présence de traces évoque ici aussi une dégradation des protéines.

Pour essayer d'améliorer la qualité des western blots, nous avons augmenté les quantités d'anticorps mis en jeu. Le sérum bovin a été dilué au 1/50, et l'anticorps conjugué a

été utilisé au 1/200. De plus, nous nous sommes servis des profils sérologiques pour sélectionner des sérums riches en anticorps.

Le résultat obtenu avec le sérum du bovin IP\_4861 est le suivant :

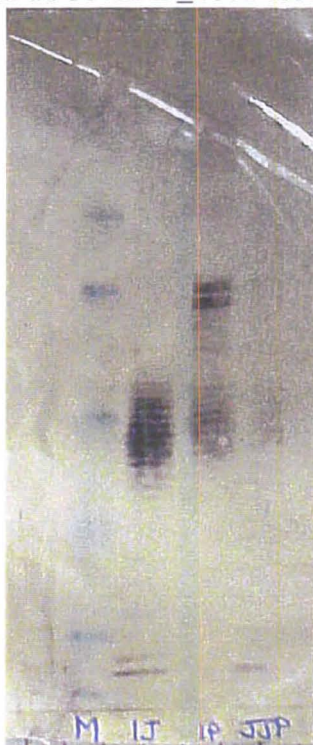


Figure 74 : western blot obtenu pour le bovin IP\_4861 en diluant le sérum au 1/50 et l'anticorps conjugué au 1/200.

Les bandes grises montrent que des anticorps du bovin vacciné réagissent avec des antigènes dont les poids moléculaires sont proches de 32,5 kDa et 47,5 kDa.

La présence de bandes grisâtres équidistantes semble être un artefact, dont l'origine est inconnue.



### 3. DISCUSSION

---

Au cours de l'essai d'immunisation, trois challenges successifs ont été réalisés.

Le challenge 0 s'est déroulé avant que les animaux soient immunisés avec des fractions intestinales de glossines.

Les challenges 1 et 2 ont été réalisés à la suite de l'immunisation, avec pour but d'enregistrer les effets provoqués sur les mouches.

Cette expérience a été menée suite à un premier essai datant de 2001, basé sur le même protocole vaccinal.

Au cours de celui-ci, des résultats encourageants avaient été obtenus. En effet, il avait été constaté :

- Une augmentation de la mortalité des mouches sur les bovins immunisés avec la fraction IP,
- Une diminution du poids des pupes dans les lots de mouches nourris sur les bovins vaccinés avec les fractions IP et JJP,
- Une diminution du taux de ponte dans les lots nourris sur les animaux inoculés avec les antigènes IP et JJP.

L'analyse des résultats du challenge 0 montre qu'il n'existe pas de différence entre les différents groupes T0, JJP0, IJ0 et IP0.

Ce résultat est satisfaisant car il montre qu'avant immunisation, les performances des groupes sont comparables.

Les résultats des différents groupes obtenus lors du challenge 1 ont été comparés entre eux par une analyse verticale. Aucune différence significative n'a pu être constatée.

De même, l'analyse des résultats du challenge 2 n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les différents groupes.

Il semble donc que l'immunisation des bovins, que ce soit avec la fraction IP, IJ ou JJP, n'a pas eu d'effet notable sur la population de mouches.

Les résultats enregistrés pour chaque groupe au cours des challenges successifs ont été comparés entre eux.

Les observations faites sur le groupe témoin montrent qu'il existe une augmentation significative des performances de reproduction, entre le challenge 0 et les challenges 1 et/ou 2. Cette augmentation concerne le cumul de ponte ainsi que le taux de ponte, et le poids moyen des pupes. En revanche, les écarts de mortalité enregistrés ne sont statistiquement pas significatifs.

Cette constatation signifie que les conditions se sont améliorées et ont permis aux mouches nourries sur les animaux non immunisés d'accroître leurs performances de reproduction.

Cette augmentation des performances de reproduction n'a pas été retrouvée pour les groupes IP, IJ et JJP.

Ceci signifie, par comparaison avec le groupe témoin, que l'immunisation a provoqué une baisse des performances de reproduction. Dans le cas contraire, on aurait dû observer pour ces groupes la même augmentation significative des cumuls et taux de ponte ainsi que celle du poids moyen des pupes.

Les conclusions des analyses verticales et horizontales diffèrent. Dans le premier cas, aucun effet n'est mis en évidence. Dans le second cas, une baisse des performances de reproduction est constatée pour chacun des groupes IP, IJ et JJP.

Du fait de la petite taille des échantillons, et de la grande variabilité individuelle au sein de chaque groupe, la puissance des tests statistiques employée est faible.

Dans cette expérience, on se trouve en limite de significativité. Il existe probablement un effet de la vaccination sur les performances de reproduction, mais celui-ci est faible.

Les résultats des différents challenges et des différents groupes révèlent une grande variabilité individuelle.

Certains lots de mouches présentent des performances plus altérées que celles de la moyenne de leur groupe.

Au sein du groupe JJP par exemple, les performances de reproduction du lot JJP\_5699 sont nettement en deçà de la moyenne.

Cette constatation laisse penser que certains bovins auraient mieux répondu à l'inoculation de la fraction immunisante. Pour ceux-ci, les effets enregistrés sur les lots de mouches sont plus importants.

Dans notre expérience, la proportion d'animaux bons répondeurs est faible, dans chacun des groupes immunisés.

Pour renforcer cette hypothèse, nous avons essayé de distinguer deux groupes d'animaux immunisés, indépendamment de la fraction antigénique avec laquelle ils ont été vaccinés. Cette séparation a été faite en fonction des performances des lots de mouches correspondant.

Les résultats du challenge 1 permettent de distinguer deux groupes :

- 5 bovins (JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387) pour lesquels les performances des mouches sont peu modifiées
- 5 bovins (JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, IJ\_5694, IP\_4861) bons répondeurs, pour lesquels les performances sont nettement moins bonnes.

De la même manière, les résultats du challenge 2 ont permis d'identifier deux groupes distincts :

- Les 7 bovins restants (JJP\_5677, IJ\_5700, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_4867, IP\_1387), chez qui l'immunisation n'a pas entraîné de conséquences importantes sur les mouches
- Les bovins JJP\_5699, IJ\_5694 et IP\_4861, pour lesquels les effets sur les lots de mouche sont importants.

Il y a donc des animaux qui répondent mieux à la vaccination que d'autres.

Les trois bovins JJP\_5699, IJ\_5694 et IP\_4861 sont inclus dans le groupe pour lequel les performances des mouches sont les plus diminuées, que ce soit au cours des challenges 1



ou 2. En revanche, les deux autres animaux bons répondeurs observés lors du challenge 1 ne sont pas retrouvés parmi les animaux bons répondeurs du challenge 2.

Le fait que l'on retrouve les mêmes animaux bons répondeurs au cours des challenges 1 et 2 est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la diminution des performances observée n'est pas un fait du hasard. Les effets sur les mouches seraient bien dus à une réponse du système immunitaire des bovins vaccinés.

Le fait qu'une partie des animaux bons répondeurs du challenge 1 ne fassent plus partie du groupe des bovins pour lesquels les performances des mouches sont les plus altérées lors du challenge 2 laisse penser que la réponse du système immunitaire est de courte durée, et que les effets sur la population de mouches s'atténuent assez rapidement.

Les profils sérologiques obtenus avec la fraction IP montrent que les animaux vaccinés avec cette fraction ont développé des anticorps anti-antigène IP.

De plus, le bovin IP\_4861, présentant le plus fort taux d'immunoglobulines est celui pour lequel les performances des mouches ont été les plus diminuées. Cette constatation conforte l'hypothèse selon laquelle certains animaux répondraient mieux à la vaccination. Pour ceux-ci, les immunoglobulines produites suite à la vaccination sont en quantité suffisante pour être responsables des effets délétères observés sur les glossines.

Les analyses de biologie moléculaire ont mis en évidence la mauvaise qualité des protéines utilisées.

Le problème est de savoir si la dégradation des protéines a eu lieu avant ou après l'immunisation des bovins.

Dans le premier cas, la vaccination des animaux avec des protéines de mauvaise qualité n'aurait pas permis de déclencher une production d'anticorps en quantité suffisante. Ceci expliquerait les résultats médiocres des western blots.

Dans le second cas, les bovins auraient été immunisés avec des protéines non dégradées. Ces protéines seraient faiblement immunogènes, ce qui expliquerait les faibles effets enregistrés sur les glossines ainsi que la mauvaise qualité des western blots (anticorps en faible quantité).

Cet aspect souligne la difficulté de réaliser des expériences d'immunisation de ce type. En souhaitant garder le système hôte - parasite naturel, nous avons été contraints de travailler sur des animaux de grand gabarit. L'immunisation de tels animaux requiert une grande quantité d'antigènes, or le mode de préparation de ces derniers présente de nombreux risques de dégradation.

Par exemple, les dissections ont été étalées dans le temps et les organes ont pu être mal conservés. De même, du fait du regroupement des organes prélevés pour obtenir des quantités d'antigènes suffisantes, la contamination d'un prélèvement par des protéases a pu entraîner la dégradation de l'ensemble de la fraction protéique.

Il aurait été judicieux de vérifier la qualité des antigènes avant de procéder à l'immunisation des bovins.

En effet, dans la présente situation, il est difficile de savoir si les mauvais résultats sont dus à la qualité intrinsèque des protéines ou s'ils s'expliquent par la dégradation des protéines utilisées.



Des paramètres non contrôlés ont certainement influencé les résultats de l'essai d'immunisation.

Les conditions météorologiques notamment ont eu un effet sur les repas de sang. Ces repas ont été effectués dans la station d'élevage, dans laquelle la température et le degré d'hygrométrie ne sont pas contrôlés. Il a été remarqué que les jours de pluie, la durée du repas de sang se trouvait augmentée. De plus, les lots nourris sur des animaux plus exposés aux courants d'air se gorgeaient moins bien ces jours-là. En conséquence, une plus forte mortalité était enregistrée pour ces groupes dans les jours qui suivaient.

Les résultats obtenus dans la présente expérience ne permettent pas de confirmer les observations faites en 2001, lors du précédent essai d'immunisation à partir d'antigènes intestinaux de glossines. En effet, on ne retrouve pas d'augmentation significative de la mortalité des mouches, et les effets observés sur les performances de reproduction sont faibles. Enfin, les dissections des mouches gorgées sur des animaux immunisés n'ont pas mis en évidence de rupture du tube digestif.

La grande variabilité de la réponse individuelle et la faible reproductivité des effets sur les populations de mouches peuvent en partie expliquer que les résultats de ces deux expériences sont différents.

De plus, en 2001, un seul animal était utilisé par groupe. Il se peut donc que les bovins utilisés dans les groupes IP et JJP notamment étaient de bons répondeurs. Cela aurait alors pu avoir un effet faussement positif sur les résultats de ces groupes.

En résumé, ce qui ressort des différentes observations est qu'il existe probablement un effet de la vaccination sur les performances des mouches. Cependant, cet effet est faible et ne concerne que les performances de reproduction des mouches. En aucun cas il n'a été observé d'augmentation directe de la mortalité des mouches.

Par ailleurs, la forte variabilité individuelle de la réponse à l'injection immunisante est à souligner. Certains animaux répondent mieux à la vaccination que d'autres. Ceci peut s'expliquer par une plus grande efficacité du système immunitaire ou pour d'autres raisons qui n'ont pas été élucidées. Toutefois, seule une faible proportion des animaux immunisés semble réagir de manière notable. Les effets observés sont donc peu reproductibles.

Les essais d'immunisation de lapins à partir d'éléments du tube digestif de *Glossina fuscipes fuscipes* (Desquesnes, 1990) avaient eux aussi donné des résultats peu encourageants. Le seul effet constaté avait été une augmentation statistiquement significative de la mortalité hebdomadaire, et aucune conséquence sur les performances de reproduction des mouches n'avait été observée.

D'autres essais d'immunisation contre les glossines ont été réalisés sur des animaux de laboratoire, avec différentes fractions immunisantes (Schlein et Lewis, 1976 ; Kaaya et Alemu, 1982 et 1984). Les résultats obtenus lors de ces expériences sont variables, mais aucun de ces travaux n'a donné de suite.

Dans le cas présent, une immunisation provoquant un faible effet sur la reproduction des mouches, et ceci seulement sur une partie de la population vaccinée, laisse peu d'espoir d'application.

Pour être efficace, il faudrait que l'antigène employé entraîne une forte réduction de la population de mouches nourries sur les animaux vaccinés, et ceci sur une forte proportion des animaux immunisés.

Ces échecs relatifs d'immunisation contre les glossines à partir de différentes fractions antigéniques rendent cette approche de la lutte contre la trypanosomose animale peu encourageante.

D'autres méthodes, comme la lutte biologique - régulateurs de croissance - ou la lutte génétique - lâchers de mâles stériles -, sont en cours d'étude à l'heure actuelle. Certaines de ces techniques ont déjà été mises en application et donnent des résultats plus prometteurs.



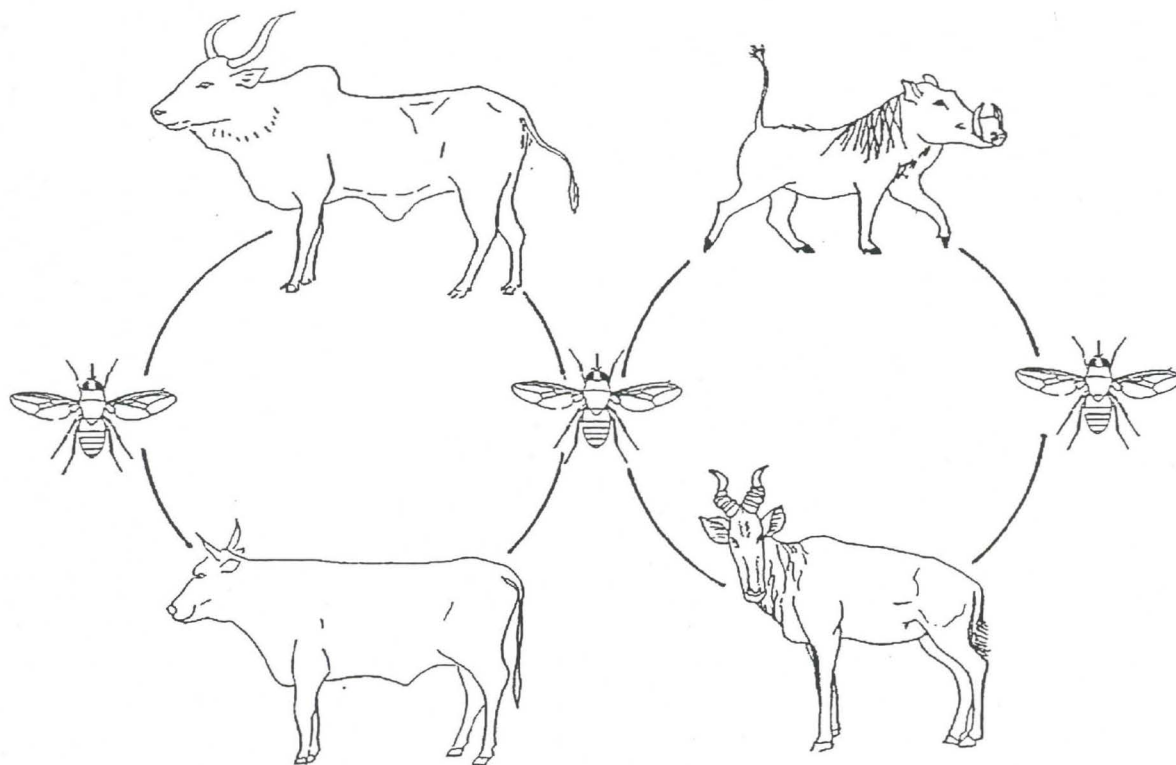


# ANNEXES



## Annexe 1

### Cycle de *T. vivax*, *T. brucei* et *T. congolense*



CYCLE DE T. VIVAX, T. CONGOLENE, T. B. BRUCEI

D. CUISANCE



## Annexe 2

### Protocole d'électrophorèse

#### 1) Deux gels de concentrations différentes sont coulés successivement

##### *a) Gel de séparation à 12,5%*

###### Composition :

Mélange Acrybis 30%	21,875 mL
TrisHCl 1,5M	13,125 mL
H <sub>2</sub> O distillée	16,625 mL
SDS 10%	525 µL
APS 10%	700 µL
Temed	70 µL

##### *b) Gel de concentration à 4%*

###### Composition :

Mélange Acrybis 30%	1,680 mL
TrisHCl 1M	1,252 mL
H <sub>2</sub> O distillée	6,900 mL
SDS 10%	100 µL
APS 10%	200 µL
Temed	20 µL

#### 2) Les échantillons de protéines sont préparés de la manière suivante

##### *a) Choix du plan d'électrophorèse*

On détermine dans quel ordre les échantillons vont être déposés dans les puits.  
Il faut toujours avoir un marqueur de taille, un témoin positif et un témoin négatif.

##### *b) Préparation des échantillons*

Les protéines sont réduites : elles sont mélangées à du Bleu de Laemmli contenant du  $\beta$ mercaptoéthanol.

Elles sont ensuite bouillies 5 minutes à 100°C, puis centrifugées.

#### 3) La cuve et le gel sont montés, la cuve est remplie avec du tampon d'électrophorèse

###### Composition :

Glycine	14,41 g
Tris base	3,03 g
SDS 10%	10 mL
H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1L

#### 4) Les échantillons de protéines sont déposés dans les puits du gel, en prenant soin de respecter l'ordre précédemment établi

### **5) L'électrophorèse est ensuite démarrée**

Le générateur est mis en marche à 25 mA le temps que les protéines traversent le gel de concentration.

On passe ensuite à 35-45 mA pour le reste du gel.

**6)** Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est soit coloré au Bleu de Coumassie, soit transféré sur membrane PVDF pour la réalisation d'un western blot

## Annexe 3

### Protocole de western blot

#### **1) Installer sur l'appareil pour le transfert sur la membrane PVDF :**

- 2 feuilles de papier Whatman imbibé de tampon de transfert
- la membrane PVDF imbibée de méthanol
- le gel de polyacrylamide
- 2 épaisseurs de papier Whatman imbibé de tampon de transfert

**! Faire des repères pour les puits et le marqueur !**

#### Tampon de transfert:

Trizma-base	25mM 2,9g
Glycocolle	190 mM 14,5g
Méthanol à 20%	200ml
H2O distillée	qsp 1L

#### **2) Fermer l'appareil, laisser 1h à 160mA.**

(Possibilité de laisser l'appareil à +4°C durant la nuit.)

#### **3) Réaliser les opérations suivantes à température ambiante et sous agitation.**

*a) Mettre la membrane à saturation pendant une heure dans du tampon de saturation (PBS) à 10% de lait écrémé.*

100 ml de PBS, 10g de lait en poudre écrémé.

*b) Incuber le premier Ac minimum 45 min dans du tampon de saturation à 5% ou une nuit à +4°C à agitation lente.*

Sérum : dilution au 1/100 ou 1/200. Soit 20 ml PBS, 20 ml lait 10%, 400 µl de sérum

Rincer 3 fois avec du PBS

*c) Incuber l'Ac conjugué pendant minimum 45 minutes*

20 ml PBS, 20 ml de lait à 10%, 40 µl d'Ac

Rincer 3 fois avec du PBS

*d) Mettre dans la solution de révélation jusqu'à apparition de bandes (environ 15 minutes)*

#### Composition :

PBS	50 ml
Méthanol	15 ml
4chloro1naphtol	15mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30%	150 µL

*e) Rincer à l'eau puis laisser sécher à l'air.*



Annexe 4

Analyses statistiques du challenge 0

Taux de mortalité

	JJP0/T0	IJ0/T0	IP0/T0
ε	0,012906181	0,03133042	0

Cumul de ponte

	JJP0/T0	IJ0/T0	IP0/T0
m1	160	154,8	156,5
m2	157,3	157,3	157,3
s²1	512	312,9	161, 7
s²2	284,9	284,9	284,9
t'0	0,149	0,204	0,075
k'	1,592	5,986	5,575
k	2	6	6
T	4,303	2,447	2,447

Taux de ponte

	JJP0/T0	IJ0/T0	IP0/T0
m1	174,1	174,1	174,1
m2	177,9	171,7	174,7
s²1	201,5	201,5	201,5
s²2	474,3	405,7	92,4
t'0	0,224	0,194	0,069
k'	1,448	5,390	5,273
k	1	5	5
T	12,706	2,571	2,571

Poids moyen des pupes

	JJP0/T0	IJ0/T0	IP0/T0
m1	23,8	23,8	23,8
m2	24,1	23,6	23,9
s²1	0,3	0,3	0,3
s²2	0,2	1,3	0,3
t'0	0,654	0,310	0,243
k'	0,703	0,299	0,749
k	1	1	1
T	12,706	12,706	12,706

Annexe 5

Analyses statistiques du challenge 1

Taux de mortalité

	JJP1/T1	IJ1/T1	IP1/T1
ε	0,206848039	0,033607513	0,010136191

Cumul de ponte

	JJP1/T1	IJ1/T1	IP1/T1
m1	191,5	177,5	192,3
m2	211	211	211
s²1	2380,5	2757,7	1405,6
s²2	376,7	376,7	376,7
t'0	0,544	1,196	0,885
k'	1,162	3,804	4,500
k	1	4	5
T	12,706	2,776	2,571

Taux de ponte

	JJP1/T1	IJ1/T1	IP1/T1
m1	225,9	225,9	225,9
m2	210,1	193,7	206,4
s²1	371,2	371,2	371,2
s²2	1717	2415,4	1331,0
t'0	0,512	1,219	0,945
k'	1,223	3,900	4,552
k	1	4	5
T	12,706	2,776	2,571

Poids moyen des pupes

	JJP1/T1	IJ1/T1	IP1/T1
m1	24,2	24,2	24,5
m2	25	25	25
s²1	1,3	0,8	0,8
s²2	0,7	0,7	0,7
t'0	0,916	1,391	0,864
k'	1,567	5,957	5,966
k	2	6	6
T	4,303	2,447	2,447

Annexe 6

Analyses statistiques du challenge 2

Taux de mortalité

	JJP2/T2	IJ2/T2	IP2/T2
ε	0,025280026	0,161413854	0,21195098

Cumul de ponte

	JJP2/T2	IJ2/T2	IP2/T2
m1	184,5	180,5	169
m2	201,8	201,8	201,8
s²1	112,5	2692,3	1946
s²2	1733,6	1733,6	1733,6
t'0	0,781	0,640	1,081
k'	3,645	5,731	5,980
k	4	6	6
T	2,776	2,447	2,447

Taux de ponte

	JJP2/T2	IJ2/T2	IP2/T2
m1	223,5	223,5	223,5
m2	199,4	201,2	191,1
s²1	1200,9	1200,9	1200,9
s²2	30,4	2845,9	1851,1
t'0	1,356	0,701	1,172
k'	3,286	5,149	5,739
k	3	5	6
T	3,182	2,571	2,447

Poids moyen des pupes

	JJP2/T2	IJ2/T2	IP2/T2
m1	24,1	24,2	24,4
m2	25,1	25,1	25,1
s²1	1, 5	2,6	2,9
s²2	0,6	0,6	0,6
t'0	1,023	1,073	0,703
k'	1,402	4,231	4,120
k	1	4	4
T	12,706	2,776	2,776





## Annexe 7

### Analyses statistiques du challenge horizontal :

#### Taux de mortalité

	IJ0/IJ1	IJ0/IJ2	IJ1/IJ2	IP0/IP1	IP0/IP2	IP1/IP2	T0/T1	T0/T2	T1/T2	JJP0/JJP1	JJP0/JJP2	JJP1/JJP2
ε	0,377	0,085	0,291	0,357	0,022	0,334	0,414	0,237	0,175	0,127	0,281	0,153

#### Cumul de ponte

	IJ0/IJ1	IJ0/IJ2	IJ1/IJ2	IP0/IP1	IP0/IP2	IP1/IP2	T0/T1	T0/T2	T1/T2	JJP0/JJP1	JJP0/JJP2	JJP1/JJP2
m1	177,5	180,5	180,5	192,25	169	192,25	211	201,75	211	191,5	160	191,5
m2	154,75	154,75	177,5	156,5	156,5	169	157,25	157,25	201,75	160	184,5	184,5
s <sup>2</sup> 1	2757,7	2692,3	2692,3	1405,6	1946	1405,6	376,7	1733,6	376,7	2380,5	512	2380,5
s <sup>2</sup> 2	312,9	312,9	2757,7	161,7	161,7	1946	284,9	284,9	1733,6	512	112,5	112,5
t'0	0,821	0,939	0,081	1,806	0,544	0,803	4,179	1,980	0,402	0,828	1,386	0,198
k'	3,653	3,193	36,912	1,661	5,509	3,735	0,717	1,514	7,449	1,207	0,721	5,043
k	4	4	6	4	3	6	6	4	4	1	1	1
T	2,776	2,776	2,447	2,776	3,182	2,447	2,447	2,776	2,776	12,706	12,706	12,706

#### Taux de ponte

	IJ0/IJ1	IJ0/IJ2	IJ1/IJ2	IP0/IP1	IP0/IP2	IP1/IP2	T0/T1	T0/T2	T1/T2	JJP0/JJP1	JJP0/JJP2	JJP1/JJP2
m1	192,5	200,4	200,4	206,1	189,7	206,1	225,8	222,1	225,8	208,9	199,3	208,9
m2	171,7	171,7	192,5	174,5	174,5	189,7	173,9	222,1	177,7	177,7	177,7	199,3
s <sup>2</sup> 1	2414,1	2844,5	2844,5	1329,4	1849,8	1329,4	370,5	1202,3	370,5	1717,3	30,3	1717,3
s <sup>2</sup> 2	405,6	405,6	2414,1	92,3	92,3	1849,8	200,4	200,4	1202,3	472,4	472,4	30,3
t'0	0,783	1,004	0,216	1,673	0,687	0,581	4,342	2,575	0,184	0,942	1,363	0,323
k'	3,829	2,986	13,877	1,792	4,362	5,157	0,690	1,164	16,287	1,061	0,733	3,091
k	4	4	6	4	3	6	6	4	5	2	1	1
T	2,776	2,776	2,447	2,776	3,182	2,447	2,447	2,776	2,571	4,303	1,96	1,96

#### Poids moyen des pupes

	IJ0/IJ1	IJ0/IJ2	IJ1/IJ2	IP0/IP1	IP0/IP2	IP1/IP2	T0/T1	T0/T2	T1/T2	JJP0/JJP1	JJP0/JJP2	JJP1/JJP2
m1	24,2	24,2	24,2	24,5	24,4	24,5	25,0	25,1	25,1	24,2	24,2	24,2
m2	23,6	23,6	24,2	23,9	23,9	24,4	23,8	23,8	25,0	24,1	24,1	24,1
s <sup>2</sup> 1	0,8	2,6	2,5	0,8	2,8	0,8	0,7	0,6	0,6	1,2	0,3	1,2
s <sup>2</sup> 2	1,3	1,3	0,8	0,3	0,3	2,8	0,4	0,4	0,7	0,3	1,5	1,5
t'0	0,760	0,578	0,019	1,074	0,591	0,055	2,502	2,833	0,183	0,046	0,010	0,043
k'	3,942	5,183	155,936	2,791	5,073	54,219	1,198	1,058	16,328	21,416	92,965	23,079
k	6	5	5	5	4	5	4	6	6	1	1	2
T	2,447	2,571	2,571	2,571	2,776	2,571	2,776	2,447	2,447	12,706	12,706	4,303





## Annexe 8

### Distinction de deux groupes : challenge 1

#### **Mortalité**

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_5694, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_4861, IP\_1387

$$m1 = 39$$

$$s^2_1 = 25$$

$$m2 = 18,428$$

$$s^2_2 = 19,952$$

$s^2_1/s^2_2 < 3$ , les deux variances peuvent être considérées comme égales et une variance commune peut être calculée :

$$s^2 = 21,214$$

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2

$H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances égales, il est possible d'utiliser le test de Student, de façon unilatérale selon les hypothèses posées.

$$t_0 = 6,472$$

$$t(8 ; 0,05) = 2,306$$

$$t_0 > t(8 ; 0,05), H_0 \text{ est rejetée}$$

Au seuil de 5%, la moyenne des taux de mortalité du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

#### **Cumul de ponte**

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387

$$m1 = 149,4$$

$$s^2_1 = 368,3$$

$$m2 = 223$$

$$s^2_2 = 90$$

$s^2_1/s^2_2 > 3$ , les deux variances sont différentes.

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2

$H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances différentes, il est indiqué d'appliquer le test de Student corrigé.

$$t'_0 = 7,687$$

$$k' = 5,844$$

$$k = 6$$

$$t(6 ; 0,05) = 2,447$$

$t'0 > t(6 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des cumuls de ponte du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

### Taux de ponte

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387

$$m1 = 168,6 \quad s^2_1 = 635,625$$

$$m2 = 233,82 \quad s^2_2 = 73,317$$

$s^2_1/s^2_2 > 3$ , les deux variances sont différentes.

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2

$H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances différentes, il est indiqué d'appliquer le test de Student corrigé.

$$t'0 = 5,477$$

$$k' = 4,910$$

$$k = 5$$

$$t(5 ; 0,05) = 2,571$$

$t'0 > t(5 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des taux de ponte du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

### Poids moyen des pupes

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5694, IJ\_5700, IJ\_5296, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_4908, IP\_1390, IP\_4867, IP\_1387

$$m1 = 23,56 \quad s^2_1 = 0,083$$

$$m2 = 25,06 \quad s^2_2 = 0,093$$

$s^2_1/s^2_2 < 3$ , les deux variances peuvent être considérées comme égales et une variance commune peut être calculée :

$$s^2 = 0,088$$

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2

$H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances égales, il est possible d'utiliser le test de Student, de façon unilatérale selon les hypothèses posées.

$$t0 = 7,995$$

$$t(8 ; 0,05) = 2,306$$

$t_0 > t(8 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des poids des pupes du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.



## Annexe 9

### Distinction de deux groupes : challenge 2

#### **Mortalité**

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_5700, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_4867, IP\_1387

$$\begin{array}{ll} m1 = 47 & s^2_1 = 0 \\ m2 = 28,6 & s^2_2 = 93,95238095 \end{array}$$

$s^2_1/s^2_2 > 3$ , les deux variances sont différentes.

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2  
 $H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances différentes, il est indiqué d'appliquer le test de Student corrigé.

$$\begin{array}{l} t'_0 = 5,030 \\ k' = 6 \\ k = 6 \\ t(6 ; 0,05) = 2,447 \end{array}$$

$t'_0 > t(6 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des taux de mortalité du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

#### **Cumul de ponte**

Groupe 1 : IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387

$$\begin{array}{ll} m1 = 106,5 & s^2_1 = 12,5 \\ m2 = 194,25 & s^2_2 = 301,642 \end{array}$$

$s^2_1/s^2_2 > 3$ , les deux variances sont différentes.

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2  
 $H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances différentes, il est indiqué d'appliquer le test de Student corrigé.

$$\begin{array}{l} t'_0 = 13,235 \\ k' = 7,978 \\ k = 8 \end{array}$$

$$t(8 ; 0,05) = 2,306$$

$t'0 > t(8 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des cumuls de ponte du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

### Taux de ponte

Groupe 1 : IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5699, IJ\_5700, IP\_4867, JJP\_5677, IJ\_4908, IJ\_5296, IP\_1390, IP\_1387

$$\begin{array}{ll} m_1 = 124,75 & s^2_1 = 2,205 \\ m_2 = 213,65 & s^2_2 = 247,305 \end{array}$$

$s^2_1/s^2_2 > 3$ , les deux variances sont différentes.

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2  
 $H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances différentes, il est indiqué d'appliquer le test de Student corrigé.

$$\begin{array}{l} t'0 = 15,711 \\ k' = 7,441 \\ k = 7 \\ t(7 ; 0,05) = 2,365 \end{array}$$

$t'0 > t(7 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des taux de ponte du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.

### Poids moyen des pupes

Groupe 1 : JJP\_5699, IJ\_5694, IP\_4861

Groupe 2 : JJP\_5677, IJ\_5700, IJ\_5296, IJ\_4908, IP\_1390, IP\_4867, IP\_1387

$$\begin{array}{ll} m_1 = 22,43 & s^2_1 = 0,753 \\ m_2 = 25,06 & s^2_2 = 0,392 \end{array}$$

$s^2_1/s^2_2 < 3$ , les deux variances peuvent être considérées comme égales et une variance commune peut être calculée :  
 $s^2 = 0,437$

Soit l'hypothèse  $H_0$  : la moyenne du groupe 1 est égale à la moyenne du groupe 2  
 $H_1 \neq H_0$

Pour la comparaison de deux variables indépendantes, de variances égales, il est possible d'utiliser le test de Student, de façon unilatérale selon les hypothèses posées.

$$t_0 = 5,276$$

$$t(8 ; 0,05) = 2,306$$

$t_0 > t(8 ; 0,05)$ ,  $H_0$  est rejetée

Au seuil de 5%, la moyenne des poids des pupes du groupe 1 est significativement supérieure à celle du groupe 2.



# BIBLIOGRAPHIE

1. ACKERMAN S., BRIAN C.F., MCGILL T.W., SONENSHINE D.E. (1981). Passage of host serum components, including antibodies, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*. *Journal of Parasitology*. **67** : 737-740.
2. ACKERMAN S., FLOYD M., SONENSHINE D.E. (1980). Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari : Ixodidae) : vaccination using tick antigens. *Medical Entomology*. **17** : 391-397.
3. ALGER N.E., CABRERA E.J. (1972). An increase in death rates *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. *J.Econ.Entomol.* **65** : 165-168.
4. ALLIGHAM P.G., KERLIN R.L., TELLAM R.L. et al. (1992). Passage of host immunoglobulin across the midgut epithelium into the haemolymph of blood fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *Journal of Insect Physiology*. **38** : sept-17.
5. ALMEIDA A.P.G. (1994). Production and activity of antisera and monoclonal antibodies against the malaria vector *Anophele stephensi*. PHD Thesis, University of London.
6. ALMEIDA A.P.G., BILLINGSLEY P.F. (1998). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi liston* (Diptera : Culicidae) - effects on mosquito survival and fecundity. *International Journal of Parasitology*. **28** : 1721-1731.
7. ANDERS R.F., SAUL A. (2000). Malaria vaccines. *Parasitology Today*. **16**(10) : 444-447.
8. BALASHOV Y.S. (1984). Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Annual review of Entomology*. **29** : 137-156.
9. BEN-YAKIR D. (1989). Quantitative studies of host immunoglobulin in the haemolymph of ticks. *Journal of Medical Entomology*. **26** : 243-246.
10. BEN-YAKIR D., MUMCUOGLU K.Y., MANOR O. et al. (1994). Immunization of rabbits with a midgut extract of the human body louse *Pediculus humanus humanus* : The effects of induced resistance on the louse population. *Medical Veterinary Entomology*. **8** : 114-118.
11. BILLINGSLEY P.F. (1994). Approaches to vector control : new and trusted two molecular targets in the insect midgut. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **88** : 136-140.
12. BOWLES V.M., FEEHAN J.P., SANDERMAN R.M. (1990). Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. *International Journal of Parasitology*. **20** : 169-174.
13. BRIAN H.K., DAVID H.K. (1994). Vaccines against arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**(6) : 87-96.
14. BROSSARD M. (1998). The use of vaccines and genetically resistant animals in tick control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **17**(1) : 188-199.

15. BROSSARD M., RAIS O. (1984). Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female of *Ixodes ricinus* fed on rabbits infested or reinfested with ticks. *Experientia*. **40** : 561-563.
16. CARTER R. (2001). Transmission blocking malaria vaccine. *Vaccine*. **19** : 2309-2314.
17. CHINZEI Y., MINOURA H. (1988). Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. *Journal of Medical Entomology*. **25** : 26-31.
18. COBON G. S. (1997). An anti-arthropod vaccine : TickGARD - a vaccine to prevent cattle tick infestations. In *New Generation Vaccines* (Edited by Levine M.M., Woodrow G.C., Kaper J.B. and Cobon G.S.). Marcel Dekker, New York.
19. COBON G.S., WILLADSEN P. (1990). Vaccines to prevent tick infestations. In *New Generation Vaccines* (Edited by Woodrow and Levin), pp 901-917. Marcel Dekker, New York and Basil.
20. DALTON J.P., MULCAHY G. (2001). Parasite vaccines - a reality? *Veterinary Parasitology*. **98** : 149-167.
21. De la FUENTE J. et al. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*) : the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genetic Analysis : Biomolecular Engineering*. **15** : 143-148.
22. DESQUESNES M. (1990). Note sur les essais d'immunisation de lapins contre les tsé-tsé, *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera : Glossinidae). *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* **43**(4) : 511-513.
23. DESQUESNES M. (1997). Les trypanosomoses du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. Thèse doctorale, Université du Droit et de la Santé, Lille. Pp. 234-237.
24. EAST I.J., EISEMANN C.H. (1993). Vaccination against *Lucilia cuprina* : the causative agent of sheep blowfly strike. *Immunol.Cell.Biol.* **71** : 453-462.
25. EAST I.J., FITZGERALD C.J., PEARSON R.D., DONALDSON R.A., VUOCOLO T., CADOGAN L.C., TELLAM R.L., EISEMANN C.H. (1993). *Lucilia cuprina* : inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membranes. *International Journal of Parasitology*. **23** : 221-229.
26. EISEMANN C.H., JOHNSON L.A.Y., BRODMEDDOW M. et al. (1990). Acquired resistance of sheep to larva of *Lucilia cuprina*, assessed in vivo and in vitro. *International Journal of Parasitology*. **20** : 299-305.
27. EISEMANN C.H., PEARSON R.D., DONALDSON R.A., CADOGAN L.C., VUOCOLO T. (1993). Uptake and fate of specific antibody in feeding larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Medical Veterinary Entomology*. **7** : 177-185.



28. ELLIS J.A., SHAPIRO S.Z., OLE M.Y., MOLOO S.K. (1986). Lesions and saliva specific antibody responses in rabbits with immediate and delayed hypersensitivity reactions to the bites of *Glossina morsitans centralis*. *Vet. Pathol.* **23** : 661-667.
29. ELVIN C.M., KEMP D.H. (1994). Generic approaches to obtaining efficacious antigens from vectors arthropods. *International Journal of Parasitology.* **24** : 67-79.
30. GARCIA-GARCIA J.C. and al. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* **18** : 2275-2287.
31. GHOSH S., KHAN M.H., AHMED N. (1999). Cross-bred cattle protected against *Hyalomma anatolicum anatolicum* by larval antigens purified by immunoaffinity chromatography. *Trop. Anim. Health Prod.* **31** : 263-273.
32. GODWIN P.K., ALEMU P. (1984). Further observations on survival and fertility of *Glossina morsitans morsitans* maintained on immunized rabbits. *Insect Sci. Applic.* **5**(5) : 443-446.
33. HATFIELD P.R. (1988). Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. *Medical Veterinary Entomology.* **2** : 331-338.
34. HATFIELD P.R. (1988). Detection and localisation of antibodies ingested with a mosquito blood meal. *Medical Veterinary Entomology.* **2** : 339-345.
35. ITARD. J., BAUER B. (1985). Elevages de glossines. Synthèse. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* **37** : 143-175.
36. KAAYA G.P., ALEMU P. (1982). Fecundity and survival of tsetse maintained on immunized rabbits. *Insect. Sci. Applic.* **3** : 237-241.
37. KAY B.H., KEMP D.H. (1994). Vaccines against arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50** : 87-96.
38. KEMP D.H., AGBEDE R.I.S., JOHNSTON L.A.Y., GOUGH J.M. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks : feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal of Parasitology.* **16**(2) : 115-120.
39. KEMP D.H., PEARSON R.D., GOUGH J.M., WILLADSEN P. (1989). Vaccination against *Boophilus microplus* : localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.* **7** : 43-58.
40. KNOX D.P., SMITH W.D. (2001). Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Veterinary Parasitology.* **100** : 21-32.
41. LAL A.A. et al. (2001). Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of Anopheles mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** : 5228-5233.

42. LEHANE M.J. (1994). Digestive enzymes, haemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood-sucking insects. *International Journal of Parasitology*. **24**(1) : 27-32.
43. LELLOUCH J., LAZAR P. (1974). Méthodes statistiques en expérimentation biologique. Ed. Flammarion Médecine-Sciences.
44. LODOS J., BOUE O., DE LA FUENTE J. (2000). A model to simulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. *Veterinary Parasitology*. **87** : 315-326.
45. McKENNA R.V., RIDING G.A., JARMEY J.M., PEARSON R.D., WILLADSEN P. (1998). Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*. **20** : 325-336.
46. MULENGA A., SUGIMOTO C., ONUMA M. (2000). Issues in tick vaccine development : identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and infection*. **2** : 1353-1361.
47. MULENGA A., SUGIMOTO C., SAKO Y., OHASHI K., MUSOKE A., SHUBASH M., ONUMA M. (1999). Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29 kDa protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect. Immun.* **67**(4) : 1652-1658.
48. MUNN E.A., SMITH T.S., GRAHAM M., TAVERNOR A.S., GREENWOOD C.A. (1993). The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*. **23**(2) : 261-269.
49. NOGGE G. (1982). Experimentally induced antibodies to ectoparasites. *Zentralbl. Bakteri.* **12** : 181-184.
50. OPDEBEECK J.P. (1994). Vaccines against blood-sucking arthropods. *Veterinary Parasitology*. **54** : 205-222.
51. OTIENO L.H., VUNDLA R.M.W., MONGI A. (1984). Observations on *Glossina morsitans morsitans* maintained on rabbits immunized with crude tsetse midgut proteases. *Insect. Sci. Applic.* **5**(4) : 297-302.
52. PRUETT J.H. (1999). Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. *International Journal of Parasitology*. **29** : 25-32.
53. RIDING G.A., JARMEY J., McKENNA R.V., PEARSON R., COBON G.S., WILLADSEN P. (1994). A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus* : purification, localization and possible function. *Journal of Immunology*. **153** : 5158-5166.
54. SANDEMAN R.M. (1996). Immune response to mosquitoes and flies. In *The immunology of Host-Ectoparasite Arthropod Relationship* (Edited by WIKEL S.K). CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
55. SCHLEIN Y., LEWIS C.T. (1976). Lesions in haematophagous flies feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiol. Entomol.* **1** : 55-59.



56. SHAHABUDDIN M. (1995). Chitinase as a vaccine. *Parasitology Today*. **11**(2) : 46-47.
57. SHARMA J.K., GHOSH S., KHAN M.H., DAS G. (2001). Immunoprotective efficacy of a purified 39 kDa nymphal antigen of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Trop. Anim. Health Prod.* **33** : 103-116.
58. SHER A. (1989). Vaccination against parasites : special problems imposed by the adaptation of the parasitic organisms to the host immune response. In *The biology of Parasitism* (Edited by ENGLUND P.T., SHER A), pp 169-182. ARL Inc., New York.
59. SIGAL L.H., ZAHRADNIK J.M., LAVIN P., PATELLA S.J., BRYANT G., HASELBY R., HILTON E., KUNKEL M., ADLERKLEIN D., DOHERTY T., EVANS J., MALAWISTA S.E. (1998). A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **339** : 216-222.
60. SMITH W.D. (1993). Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. *Research in Veterinary Science*. **54** : 94-101.
61. SMITH W.D., SMITH S.K., MURRAY J.M. (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*. **16** : 231-241.
62. SMITH W.D., VAN WYK J.A., VAN STRIJP M.F. (2001). Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. *Veterinary Parasitology*. **98** : 285-297.
63. SUKARSIH, PARTOUTOMO S., SATRIA E., WIJFFELS G., RIDING G., EISEMANN C., WILLADSEN P. (2000). Vaccination against the Old World Screwworm Fly (*Chrysomya bezziana*). *Parasite Immunology*. **22** : 545-552.
64. SUTHERLAND G.B., EWEN A.B. (1974). Fecundity decrease in mosquito ingesting blood from specifically sensitised mammals. *J. Insect. Physiol.* **20** : 655-660.
65. TELLAM R.L., SMITH D., KEMP D.H., WILLADSEN P. (1992). Vaccination against ticks. In *Animal Parasite Control Utilising Biotechnology* (Edited by YONG W.K.), pp 303-331. CRC Press, Boca Raton, Florida.
66. TELLAM R.L., VUOCOLO T., EISEMANN C., BRISCOE S., RIDING G., ELVIN C., PEARSON R. (2003). Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin 55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **33** : 239-252.
67. TRAGER W. (1939). Further observation on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Parasitology*. **25** : 137-139.
68. TRAGER W. (1939). Acquired immunity to ticks. *Journal of Entomology*. **25** : 235-264.
69. TRIMNELL A.R., HAILS R.S.; NUTTALL P.A. (2002). Dual action ectoparasite vaccine targetting "exposed" and "concealed" antigens. *Vaccine*. **20** : 3560-3568.



70. USPENSKY I. (1999). Tick as the main target of human tick-borne disease control : Russian practical experience and its lessons. *J. Vector Ecol.* **24** : 40-53.
71. VAUGHAN J.A., AZAD A.F. (1988). Passage of host immunoglobulin G from blood meal into haemolymph of selected mosquito species (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology.* **25** : 472-474.
72. WEBSTER K.A., RANKIN M., GODDARD D.W.T., COLES G.C. (1992). Immunological and feeding studies on antigens derived from the biting fly, *Stomoxys calcitrans*. *Veterinary Parasitology.* **44** : 143-150.
73. WIKEL S.K. (1996). A synthesis of current concepts regarding the immunology of the Host-Arthropod interface. In *The immunology of Host-Ectoparasite Arthropod Relationship* (Edited by WIKEL S.K.), pp 316-318. CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
74. WIKEL S.K. (1988). Immunological control of haematophagous arthropod vectors : utilization of novel antigens. *Veterinary Parasitology.* **29** : 235-264.
75. WIKEL S.K., ALARCON-CHAIDEZ F.J. (2001). Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Veterinary Parasitology.* **101** : 275-287.
76. WIKEL S.K., BERGMAN D. (1997). Tick-host immunology : significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today.* **13**(10) : 383-388.
77. WIKEL S.K., BERGMAN D., RAMACHANDRA R.N. (1996). Immunological-based control of blood-feeding arthropods. In *The immunology of Host-Ectoparasite Arthropod Relationship* (Edited by WIKEL S.K.). CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
78. WILLADSEN P. (1997). Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology.* **71** : 209-222.
79. WILLADSEN P. (2001). The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology.* **101** : 353-367.
80. WILLADSEN P. (1997). Vaccines, genetics and chemicals in tick control : the Australian experience. *Trop. Anim. Health Prod.* **29** : 91S-94S.
81. WILLADSEN P. (1999). Immunological control of ectoparasites : past achievements and future research priorities. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* **15** : 131-137.
82. WILLADSEN P., BILLINGSLEY P.F. (1996). Immune intervention against blood-feeding insects. In *Biology of the Insect Midgut* (Edited by Lehane M.J., Billingsley P.F.), pp 323-344. Chapman & Hall, London.
83. WILLADSEN P., BIRD P., COBON G.S., HUNGERFORD J. (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology.* **110** : S43-S50.
84. WILLADSEN P., EISEMANN C.H., TELLAM R.L. (1993). Concealed antigens : expanding the range of immunological targets. *Parasitology Today.* **9** : 132-135.

85. WILLADSEN P., JONGEJAN F. (1999). Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology Today*. **15** : 258-262.
86. WILLADSEN P., KEMP D.H. (1988). Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitology Today*. **4** : 196-198.
87. WILLADSEN P., Mc KENNA R.V. (1991). Vaccination with 'concealed' antigens : myth or reality? *Parasite Immunology*. **13** : 605-609.
88. WILLADSEN P., RIDING G.A., Mc KENNA R.V., KEMP D.H., TELLAM R.L., NIELSEN J.N., LANHNSTEIN J., COBON G.S., GOUGH J.M. (1989). Immunological control of a parasitic arthropod. *Journal of Immunology*. **143** : 1346-1351.